

LA CULTURE DES ULTRAVIRUS APPLICATION A LA CULTURE DU VIRUS APHTEUX

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Mai 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Thadée STARON

Né le 24 MARS 1930, à TRZCIANA (Pologne)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Éditeurs

42, quai Gailleton, 42

—
1955

LA CULTURE DES ULTRAVIRUS
APPLICATION A LA CULTURE DU VIRUS APHTEUX

LA CULTURE DES ULTRAVIRUS

APPLICATION A LA CULTURE DU VIRUS APHTEUX

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Mai 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Thadée STARON

Né le 24 MARS 1930, à TRZCIANA (Pologne)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Éditeurs

42, quai Gailleton, 42

—
1955

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur.

M. JUNG.

Professeurs honoraires

BASSET.
DOUVILLE.
CUNY.

PROFESSEURS

Physique, Chimie et Toxicologie, Pharmacie,
Hygiène du lait
Anatomie descriptive des animaux domestiques.
Tératologie.
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière mé-
dicale.
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologi-
que, Inspection des viandes
Parasitologie et Maladies parasitaires, Zoologie
appliquée, Botanique, Clinique des maladies
parasitaires.
Pathologie chirurgicale, Médecine opératoire et
Ferrure, Sémiologie, Clinique chirurgicale..
Pathologie médicale des Equidés et des Carnas-
siers, Sémiologie et Propédeutique, Jurispru-
dence vétérinaire, Médecine légale, Clinique
médicale.
Pathologie de la Reproduction, Sémiologie et
Pathologie de la reproduction chez les animaux
domestiques, Obstétrique, Clinique
Maladies microbiennes, Police sanitaire, Microbio-
logie et pathologie générale, Clinique spéciale.
Zootechnie et appréciation des animaux domes-
tiques, aliments du bétail, agronomie et hygiène
des animaux, économie rurale

MM. TAPERNOUX

TAGAND.

JUNG.

LUCAM.

EUZEBY.

COLLET.

BRION.

BERTRAND.

GORET.

JEAN-BLAIN.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BARONE, FERRANDO, JOUBERT, BOST, MAGAT, Agrégés
MM. COULON, FERNEY, FLACHAT, COTTEREAU.

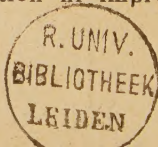
EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur SÉDALLIAN.

Premier Assesseur : M. le Professeur GORET.

Deuxième Assesseur : M. le Professeur LUCAM.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.



A MES PARENTS

Modeste gage de ma profonde reconnaissance.

A MON EPOUSE

Témoignage de mon amour.

A MA SŒUR

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SEDALLIAN

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter
la présidence du jury de notre thèse.

Hommages respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GORET

Qu'il trouve ici l'expression de notre plus vive gratitude pour la sympathie et la grande bienveillance dont il a témoigné à notre égard.

Ce travail n'est qu'un minuscule reflet de l'enseignement magistral qu'il nous a prodigué.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LUCAM

Qui fut pour nous un maître bienveillant et sympathique et que nous sommes heureux de voir participer à notre jury de thèse.

A MONSIEUR LE CHEF DE TRAVAUX AGRÉGÉ JOUBERT

Pour l'intérêt qu'il a témoigné à notre travail.

Les conseils qu'il nous a donnés, appuyés par sa profonde connaissance de la biologie ont eu une grande influence sur notre orientation.

A MONSIEUR LE DOCTEUR GIRARD

Qui nous a accordé toute facilité pour poursuivre ces études à l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse.

A MONSIEUR LE DOCTEUR MACKOWIAK

Qui a bien voulu mettre à notre disposition toutes les données nécessaires sur la culture Frenkel.

Ses conseils et suggestions, ainsi que la sympathie qu'il nous a témoignée, nous ont été d'un précieux recours.

PLAN

INTRODUCTION

Première partie

CULTURE DES ULTRAVIRUS IN VIVO

- I. — Généralités.
- II. — Application de la méthode de la culture des virus in vivo à la fabrication des vaccins.
 - Choix du virus. Choix de l'animal producteur du virus.
 - Choix du tissu. Moment du prélèvement.
- III. — Utilisation des virus de culture dans la lutte contre quelques maladies infectieuses.
 - Vaccine. Rage. Fièvre jaune. Maladie de Carré. Peste équine. Peste bovine, Peste porcine. Maladie de Newcastle.
- IV. — Avantages et inconvénients de la culture des ultravirus in vivo.

Deuxième partie

CULTURE DES ULTRAVIRUS IN OVO

- I. — Généralités.
- II. — Technique de la culture in ovo.
 - Provenance des œufs. Incubation préliminaire. Mirage.
 - Matériel. Méthode des inoculations.

III. — Facteurs influençant la sensibilité de l'embryon vis à vis des virus.

Voie d'inoculation. Température de l'incubation. Age de l'embryon. pH du liquide allantoïque. Autre facteur.

IV. — Lésions.

V. — Culture des ultravirus sur tissus greffés dans l'œuf embryonné.

VI. — Application de la méthode de la culture des virus in ovo à la fabrication des vaccins.

Les virus-vaccins modifiés. Les virus-vaccins inactivés.

VII. — Avantages de la culture des virus in ovo.

Troisième partie

CULTURE DES ULTRAVIRUS IN VITRO

I. — Généralités.

II. — Techniques générales.

L'asepsie. Récipients de culture et instruments. Les milieux de culture. Choix du tissu de culture.

III. — Les méthodes de culture.

Culture des virus sur cellules en voie de prolifération.
Culture des virus sur cellules en survie.

IV. — Facteurs influençant la culture des ultravirus in vitro.

Température. pH. Milieu nutritif. Rapport quantitatif entre le tissu et le milieu liquide. Pression osmotique. Oxygénation.

V. — Application de la méthode de la culture des virus in vitro à la fabrication des vaccins.

VI. — Avantages de la culture des ultravirus in vitro.

Quatrième partie

MODES DE CULTURE DU VIRUS APHTEUX

I. — Culture du virus aphteux in vivo.

Culture sur bovins. Culture chez les petits animaux de laboratoire. Culture sur tumeur greffée. Culture sur embryome géant.

II. — Culture du virus aphteux in ovo.

III. — Culture du virus aphteux sur tissus greffés sur la chorioalantoïde de l'œuf en incubation.

IV. — Culture des virus aphteux in vitro.

Historique.

La culture du virus aphteux selon Frenkel.

CONCLUSIONS.

INTRODUCTION

Comme toutes les sciences biologiques la pathologie animale est demeurée très longtemps une science d'observation.

Les premiers auteurs qui ont étudié les maladies des animaux et de l'homme se sont en effet contentés de décrire les symptômes, de les classer et d'enregistrer les lésions macroscopiques ; puis les pathologistes ont étudié les conditions de propagation des maladies et cherché à les enrayer par des moyens très empiriques. A ce stade purement descriptif a succédé une étude plus approfondie faisant appel à des méthodes expérimentales. Celles-ci furent inaugurées par Pasteur qui découvrit les agents des maladies, et toute la microbiologie naquit de ses premiers travaux. Ce sont ses techniques qui, perfectionnées peu à peu, ont donné à cette science toute l'ampleur qu'elle possède aujourd'hui. Plus tard on a tenté de connaître le mode de reproduction des microbes, leur cycle végétatif, enfin les chercheurs ont étudié les relations physiologiques qui s'établissent entre le microbe et l'hôte. Ces relations sont plus ou moins étroites. Certains comme les germes de la putréfaction où le bacille tétanique ne sont pas nécessairement parasites. On les rencontre non seulement chez les animaux vivants qu'ils tuent en sécrétant des substances toxiques, mais encore sur n'importe quels débris et fumiers où ils vivent en saprophytes. D'autres plus spécialisés comme le bacille de Koch ou de la morve ne se rencontrent que sur des espèces bien déterminées et non sur des débris désorganisés, mais sont néanmoins capables de se développer à partir de substances organiques et minérales convenablement choisies, si bien qu'on peut les cultiver in vitro sur des milieux analogues à ceux que l'on emploie pour les espèces purement saprophytes.

En ce cas, si l'on examine de près la nature de ces relations, on remarque que le développement d'un microbe sur un animal exige que celui-ci le tolère et qu'il lui fournisse en outre les éléments nécessaires à la croissance. Ainsi la bactériémie charbonneuse n'attaque que certains animaux (Cheval, ovins, bovins,

porcs, etc...) mais elle est incapable de se développer chez la poule parce que l'organisme de celle-ci se défend *par un mécanisme chimique*.

Enfin ces relations peuvent devenir, quelquefois, tellement étroites, que non seulement le germe n'attaque que des animaux appartenant à une seule espèce ou à un seul genre, mais qu'il lui est impossible de se développer en dehors des tissus vivants de ces animaux : c'est le cas des ultravirus.

De nombreux chercheurs ont essayé de cultiver ces agents pathogènes sur des extraits divers, tels que des filtrats, des macérations d'organes sensibles, etc... mais ce fut en vain. Tout se passe, en effet, comme si les composants de la cellule animale subissaient au moment de la mort des altérations qui les rendent inutilisables pour les virus qu'ils hébergent lors de la maladie naturelle. D'autres essais réalisés avec des milieux synthétiques n'ont pas été plus fructueux.

Il n'est guère surprenant que l'on ne soit jamais parvenu à cultiver les ultravirus sur des milieux inertes, car il semble bien que leur multiplication exige la participation active des cellules dont ils constituent en quelque sorte des produits de déviation du métabolisme normal. On ne peut donc envisager leur culture qu'en les associant à des cellules vivantes.

Cette culture associée de virus et de tissus peut être réalisée sur l'animal sensible lui-même, dans l'œuf de poule embryonné ou sur culture de tissus.

Il n'est pas douteux qu'une meilleure connaissance de la multiplication des virus et de leurs relations avec les cellules sensibles doit fournir des moyens de les combattre plus efficacement.

La question des cultures de virus a été l'objet de très nombreuses recherches, et malgré cela, encore actuellement, les travaux publiés soutiennent des opinions diverses et parfois contradictoires. Il est certain que l'absence de visibilité de la plupart des virus à l'aide de la microscopie en lumière blanche et le fait qu'il a été impossible jusqu'à ce jour de les cultiver en dehors de la cellule vivante, augmentent par là les difficultés de leur étude.

C'est pourquoi nous ne saurions envisager ici de présenter ou de résumer tous les travaux qui ont trait à l'étude des virus.

Sans entrer dans le détail des problèmes théoriques non encore

résolus que pose la culture des virus, nous étudierons les principales applications permises par cette technique. Après un exposé des différentes méthodes de culture (in vivo, in ovo, in vitro) nous insisterons plus particulièrement sur le rôle que jouent certains de ces virus de culture dans la prophylaxie des maladies humaines et animales.

PREMIERE PARTIE

CULTURE DES ULTRA-VIRUS IN VIVO

I. — Généralités.

L'étude des maladies à virus bénéficie dans le domaine expérimental, de diverses méthodes qui ont pour but de faciliter, soit le prélèvement ou l'isolement des virus, soit leur concentration ou leur purification, soit leur entretien sur les animaux de laboratoire, soit encore leur production en masse en vue de la fabrication des vaccins.

Il n'est pas question de traiter en détail toutes les techniques aujourd'hui en usage dans l'étude des virus. Nous n'envisageons ici que les méthodes de culture des virus qui ont permis l'obtention de vaccins efficaces contre des maladies, qui étaient des redoutables fléaux décimant les populations et le cheptel.

Depuis longtemps on a recherché des méthodes pour immuniser artificiellement contre les maladies à virus : l'immunité passive par l'emploi d'un sérum hyperimmun, l'inoculation simultanée de sérum et de virus, l'utilisation d'un virus inactivé par certains agents chimiques et la plus vieille méthode de toutes c'est-à-dire l'utilisation d'un virus modifié par passages chez d'autres espèces animales, ont été tour à tour utilisés.

Les vaccins tués par la chaleur et les agents chimiques, qui sont communément utilisés contre les maladies bactériennes, n'ont qu'une valeur tout à fait relative contre les maladies à virus.

Pour suppléer à cette insuffisance on a employé des virus modifiés après passage chez un hôte non naturel. Le vaccin de Jenner contre la variole en est un exemple classique et le vaccin de Pasteur contre la rage est basé sur le même principe.

Dans ce vaste sujet, il est curieux de noter que, malgré le succès et la longue période d'application de ces premières méthodes

vaccinales, ce n'est qu'assez récemment qu'elles ont été utilisées contre d'autres infections et ont pris un essor considérable.

II. — Application de la méthode de la culture des virus in vivo à la fabrication des vaccins.

A. — CHOIX DU VIRUS.

Toutes les souches d'un même virus ne peuvent être utilisées sans discernement en vue de la préparation d'un vaccin. Il y a lieu de considérer d'abord la pluralité antigénique de certains virus : ensuite la variabilité à l'intérieur d'un même type antigénique ; enfin la qualité immunigène propre, de chaque souche voire d'une variante.

Il suffira de rappeler l'existence des trois types antigéniques du virus aphteux ; les deux types du virus de la stomatite vésiculeuse ; les cinq types du virus de l'exanthème vésiculeux du porc ; les quatre types de l'encephalomyélite du cheval. Chacun de ces types étant incapable de conférer l'immunité vis-à-vis d'un autre. Un vaccin devra donc renfermer le type de virus contre lequel on veut vacciner, soit, être polyvalent et dirigé contre plusieurs types.

A l'intérieur d'un même type peuvent exister des variantes antigéniques vraies, décelées par la réaction de déviation du complément et par les recherches d'immunité croisée. Les travaux de Michelsen et de Traub ont montré leur existence pour chacun des trois types du virus aphteux. Chaque variante conserve d'ailleurs son cachet antigénique original et la souche type est capable de vacciner en partie contre elles. Il s'agit donc bien d'une simple variation d'un type antigénique fixe.

Dans d'autres cas, les épreuves d'immunité indiquent que sans qu'il y ait pluralité ou variabilité antigénique, diverses souches d'un même caractère antigène ne peuvent vacciner vis-à-vis de souches homologues. Il s'agirait là d'une question de variations qualitatives de la virulence propres à ces souches.

Gallia au Vénézuëla signale que le vaccin pastorien se révèle insuffisant vis-à-vis d'une infection rabique provoquée par un virus transmis aux bovins par les vampires. Aux U.S.A. et en Afrique du Nord a été décelé un virus de la peste porcine suscep-

tible de vaincre une immunité solidement établie vis-à-vis du virus ayant servi à l'immunisation. Au Mexique, un vaccin antiaphteux européen du type A, hautement immunigène, ne protège cependant pas le bétail contre une souche autochtone, du même type.

Les recherches de Neitz ont montré que dans la blue-tongue, une souche ne vaccine rigoureusement que contre la souche homologue. Enfin les variantes du même ordre dans la peste équine, l'encéphalomyélite équine, la maladie de Carré et la peste bovine sont bien connues.

Enfin, ultra-virus comme bactéries ont un pouvoir immunigène propre qui apparaît comme un caractère indépendant du type antigénique et de la virulence. Par exemple Remlinger a montré que le virus fixe de Pasteur possédait un pouvoir immunigène beaucoup plus élevé que le virus des rues. Des faits analogues ont été signalés pour d'autres ultravirus, notamment pour celui de la fièvre aphteuse.

B. — CHOIX DE L'ANIMAL PRODUCTEUR DU VIRUS.

L'animal producteur de virus pourra être soit un animal appartenant à l'espèce sensible, soit un animal d'une autre espèce, réceptive ou réfractaire à ce même virus dans les conditions naturelles.

Des voies d'inoculations propres à conférer une infection sévère et une multiplication considérable du virus, seront choisies. En général celles-ci se font au niveau du tissu sensible, ainsi : inoculation intracérébrale du virus rabique au chien ; inoculation sous-cutanée en plusieurs points du virus claveleux au mouton ; inoculation dans la muqueuse linguale du virus aphteux, etc...

Il peut être plus avantageux ou plus simple de choisir une espèce animale différente de celle à immuniser et qui se révélera naturellement très sensible (mouton et rage ; furet, renard, vison et maladie de Carré) ou au contraire peu sensible (chèvre et peste bovine).

On peut également s'adresser aux espèces réfractaires, dont la résistance est vaincue par certains artifices, ainsi par les voies d'inoculation ou par les passages répétés, alternés ou non. Ont été adaptés par ces procédés : le virus de la peste équine à la souris ; le virus de la maladie de Newcastle au hamster et au canard ; les virus de la peste bovine et de la peste porcine au lapin ; le virus de la fièvre jaune à la souris.

La biologie et le pouvoir pathogène d'un ultravirus ainsi animalisé se modifient et son adaptation à une espèce, à un tissu ou à ces deux éléments, devient telle qu'il peut être impunément injecté et utilisé comme vaccin pour une autre espèce naturellement sensible.

C. — CHOIX DU TISSU.

Sur un animal expérimentalement infecté tous les tissus ne sont pas également riches en virus et il importe de choisir celui qui fournira un matériel virulent de choix. Dans les infections douées d'un tropisme bien défini la récolte du virus se fait au niveau des tissus spécifiquement atteints. Ce tissu correspond en général au point d'inoculation du virus, qu'il s'agisse d'espèces sensibles, peu sensibles ou réfractaires : aphtes de la muqueuse linguale dans la fièvre aphteuse ; centres nerveux dans les infections spontanément neurotropes (rage, encéphalites) ou dans les infections artificiellement neurotropes (virus de la peste équine et virus de la fièvre jaune chez la souris).

Dans les processus septicémiques, pantropes ou mésenchymotropes, à virus dispersé dans tous les organes, tous les tissus de l'animal infecté n'ont point pour autant la même valeur au point de vue de la préparation des vaccins. D'autre part la valeur immunisante des différents organes n'est pas toujours directement liée à la teneur en virus. Jacotot puis Le Roux montrent en matière de peste bovine que le virus ne possède pas toujours l'aptitude à donner un vaccin, cette aptitude semble directement liée à la constitution lymphoïde ainsi qu'à l'importance de la fonction lymphopoïétique des organes utilisés. Les organes d'animaux âgés fournissent des vaccins d'une activité moyenne, nettement inférieure à celle des vaccins fournis par les organes d'animaux jeunes.

Il y a là une relation directe entre la diminution de la valeur immunigène et l'évolution des organes lymphoïdes.

Il en est de même dans le cas de la peste porcine où les tissus autres que la rate, les ganglions et la moelle osseuse sont impropres à la préparation d'un vaccin efficace contre cette maladie.

D. — MOMENT DU PRÉLÈVEMENT.

Le moment où seront prélevés les tissus virulents est important. S'il s'agit de lésions locales, le prélèvement ne souffre pas de

difficultés : il est effectué dans le plein épanouissement des lésions. Si l'infection expérimentale réalisée est sûrement mortelle, on a intérêt à sacrifier l'animal à la période agonique (rage du lapin, maladie de Carré chez le furet). Dans les infections septicémiques, le moment du prélèvement se situe aux environs immédiats de l'acmé thermique.

III. — Utilisation des virus de culture dans la lutte contre quelques maladies infectieuses.

A. — VACCINE.

Dans la majorité des laboratoires s'intéressant à la production du vaccin pour la prophylaxie antivariolique, la méthode classique de culture du virus vaccinal est encore utilisée [65].

Cette méthode consiste, dans la scarification et l'infection avec le virus vaccinal de la peau de génisses cliniquement saines.

L'animal est tondusur toute la surface du corps. Il est ensuite immobilisé sur une table de vaccination et rasé, après savonnage de toute la surface tondue. Cette surface est ensuite abondamment lavée et brossée avec de l'eau et des brosses stérilisées, puis séchée et soigneusement scarifiée au moyen de scarificateurs à lames multiples, enfin toute la surface scarifiée est enduite de virus vaccinal.

Cette génisse devra, autant que faire se peut, être protégée contre les infections accidentelles, ce qui nécessite une continuelle attention et des conditions d'hébergement très hygiéniques. Dans ce but elle sera recouverte d'une toile stérile, puis amenée dans un local dont le sol est recouvert de claies.

Après 4 à 5 jours, selon le développement des pustules, la génisse est fixée sur la table d'opération et la zone infectée est lavée et séchée. Les pustules sont recueillies par raclage à l'aide d'une curette de Volkamm. Lorsque la récolte est terminée l'animal est abattu et soigneusement examiné. De plus un examen bactériologique est effectué de façon à exclure toute contamination bactérienne. C'est seulement lorsqu'on a démontré que l'animal est libre de toute maladie que l'on peut considérer la pulpe comme susceptible d'être utilisée en vue de la fabrication du vaccin. Pour l'obtention de celui-ci on procède de la façon

suivante : A une partie de pulpe congelée ou fraîchement récoltée on ajoute cinq parties d'un mélange de glycérine et de sérum (70 parties de glycérine pour 30 de sérum). Cette suspension est broyée puis tamisée sur des toiles à mailles fines. On obtient un liquide épais sirupeux : c'est le vaccin. Celui-ci devra subir avant d'être livré au commerce toute une série d'épreuves pour être purifié et contrôlé. On lui ajoute des antiseptiques ou des antibiotiques pour le débarrasser des bactéries et des moisissures. Malgré ceci il est très difficile sinon impossible d'obtenir un vaccin qui soit complètement stérile. De plus il contient des substances inflammatoires telles que les leucocytes dégénérés, des déchets de tissu cutané, divers composants sanguins et des impuretés qui pourraient être à l'origine de l'encéphalite post-vaccinale.

La conservation de la pulpe ou du vaccin se fait au congélateur à de très basses températures. Le virus peut également être lyophilisé. La vaccination est pratiquée à la face externe du bras par 3 scarifications à l'aide d'un vaccinostyle et dépôt de 3 gouttes de vaccin.

Il n'est pas nécessaire d'insister sur la valeur de cette vaccination qui mis à part les rares cas d'encéphalite qu'elle provoque a donné les meilleurs résultats et a permis d'enrayer les épidémies de variole, véritable fléau mondial.

B. — RAGE.

Depuis plus de soixante ans que, dans la centaine d'instituts antirabiques répandus dans le monde, on fait passer de lapin à lapin le virus rabique fixe distribué par Pasteur lui-même ou provenant de diverses souches de virus des rues, de nombreuses modifications de ses propriétés se sont produites.

Depuis Pasteur il est classique d'admettre l'adaptation du virus rabique au système nerveux du lapin et sa perte de virulence pour le tissu cutané de l'homme et des animaux. On connaît « le fait de Pröscher » et l'audacieuse expérience de Nisch. Le savant allemand a pu sans aucune suite injecter dans le tissu conjonctif d'une personne, une émulsion de virus fraîchement extrait d'une moelle de lapin. Nisch a pu sans aucun incident pratiquer la même inoculation sur lui-même. Le virus de passage en devenant extrêmement neurotrope, a donc perdu à peu près tout pouvoir infectieux pour le tissu conjonctif sous-

cutané. Cette inocuité est cependant loin d'être absolue. Le fait de donner la rage avec du virus fixe par voie sous-cutanée dépend uniquement du hasard qui fait qu'une terminaison nerveuse ou un filet nerveux entrent en contact avec l'émulsion virulente injectée. D'autre part les virus diffèrent les uns des autres selon les instituts autant que le virus des rues lui-même.

Quoi qu'il en soit la méthode pastorienne de vaccination antirabique est encore de nos jours très employée et donne quand elle est bien exécutée d'excellents résultats.

Mode de préparation du vaccin à l'Institut Pasteur de Paris
[65].

Les lapins sont inoculés avec le virus fixe (Souche Pasteur) par voie intracérébrale. Ils sont saignés dès que les paralysies sont généralisées. Les mœlles sont aussitôt extraites selon la technique d'Oshida, avec un mandrin nickelé stérile introduit dans le canal rachidien après section perpendiculaire de celui-ci aux deux extrémités. Après leur extraction elles sont divisées par section de 2 ou 3 fragments, suspendues par un fil stérilisé dans les flacons à deux tubulures de Pasteur, dont le fond est garni de potasse caustique. La dessiccation des mœlles se fait dans une chambre-étuve réglée à 22 — 23°. Les mœlles sont ainsi soumises à l'atténuation pendant 2 à 4 jours puis fixées au stade voulu par immersion dans la glycérine et conservées à la glacière. Elles sont utilisables pendant une quinzaine de jours.

Pour le traitement, les personnes mordues reçoivent journellement en injection sous-cutanées 3 à 4 mm de mœlle longuement triturée dans 3 cc d'eau stérile. Les premières inoculations se font avec les mœlles de 4 jours, les dernières avec des mœlles de 2 jours.

Le traitement est suivi pendant 15 à 18 jours.

Le virus fixe, après 24 heures de dessiccation a pratiquement perdu la propriété de cheminer le long des nerfs (Lépine et Cruveilhier).

Les mœlles de 5 jours sont déjà trop atténuées.

La vaccination des chiens s'effectuera en deux temps à 8 jours d'intervalle.

La méthode pastorienne quoique efficace présente certains inconvénients. Elle nécessite une technique très rigoureuse et une minutie d'exécution pour la préparation des mœlles : elle

ne peut être mise en œuvre que dans un institut bien organisé. En outre, il peut arriver que, quelle que soit l'aseptie, les moelles renferment un certain nombre de germes généralement d'origine agonique.

C'est pourquoi les nombreux chercheurs qui ont travaillé la question se sont efforcés à améliorer cette technique.

Fermi [29] prépare un vaccin phéniqué à base d'encéphale de lapin ou de mouton, où le virus cultive également très bien.

Après le prélèvement, le cerveau est finement broyé en présence de billes de verre, puis il est émulsionné à 5 % et additionné d'ac. phénique (1 %). Si l'émulsion est bien faite il est inutile de filtrer. Le vaccin est gardé 24 heures à une température variant entre 20 et 22° puis conservé à la glacière à + 4°. Ce vaccin est utilisable pendant 3 à 4 mois. Les doses à injecter sont de 3 à 6 cc selon l'âge.

Dans la pratique la perfection du broyage joue un rôle capital dans la préparation du vaccin, aussi bien que dans son inocuité et sa conservation. Les vaccins renfermant de grosses particules par suite d'un broyage sommaire peuvent se montrer virulents pendant longtemps et leur action est plus irrégulière.

Bien que ce vaccin soit préparé par l'addition d'acide phénique il contient du virus encore vivant, il est capable par une application unique, de conférer aux chiens une immunité qui dure au moins un an. En outre il est possible d'obtenir par cette méthode de grandes quantités de vaccin à un prix relativement réduit en employant des moutons comme animaux producteurs de virus fixe.

De nombreux auteurs se sont inspirés de ces deux méthodes et de multiples variantes ont été proposées.

Ces vaccins ont permis d'organiser une prophylaxie sévère, grâce à laquelle l'éradication totale de la rage a pu être obtenue dans certains pays et notamment en France.

Les suites des vaccinations et du traitement chez les humains et les animaux sont quelquefois très graves, des phénomènes neuro-paralytiques peuvent s'en suivre.

L'étiologie de ces accidents a été très discutée : pour certains il s'agit d'accidents dus au virus des rues inoculé par l'animal mordeur, en somme d'une rage atténuée sous l'influence du traitement. Pour d'autres, il s'agit d'accidents dus au virus fixe inoculé

pour le traitement ou la vaccination. Ce sont ces accidents qui ont été qualifiés de rage de laboratoire. Enfin, la plupart des auteurs pensent que les accidents n'ont rien à voir avec le **virus** rabique ; il s'agirait de phénomènes survenant chez des sujets prédisposés et sensibilisés par les antigènes de la moelle et du cerveau.

Ces antigènes seraient à l'origine des réactions tissulaires parfois violentes, au niveau du système nerveux.

Quoi qu'il en soit, la pathogénie des accidents post-vaccinaux demeure le plus souvent inexpiquée. Dans les cas heureusement rares, où ils entraînent la mort, il est quelquefois possible, de retrouver le virus incriminé (virus fixe ou virus de rues). Dans la plupart des cas la guérison du malade ne permet pas d'élucider le problème.

S'il est vrai que les accidents paralytiques, par leur rareté et leur relative bénignité habituelle, ne doivent pas être mis un instant en balance avec les bienfaits de la vaccination antirabique, il n'en est pas moins vrai que la notion de leur éventualité si rare soit-elle, incitera de plus en plus à choisir pour la vaccination et le traitement antirabiques, parmi les méthodes efficaces ayant fait leurs preuves ; notamment celles qui s'accompagnent le plus rarement de cette complication si justement redoutée.

C. — FIÈVRE JAUNE.

En 1930 Theiler [106] découvrit que l'inoculation intracérébrale du virus de la fièvre jaune tuait par encéphalite la souris suisse en 3 ou 4 jours. Des passages en série de cerveau à cerveau développèrent le neutropisme du virus, qui n'en perdit point pour autant la totalité de ses affinités viscérales pour le hérisson. Son passage en série de foie à foie chez le singe peut lui restituer son viscérotropisme original, éventuellement ce retour peut être spontané. Cependant inoculé sous la peau du singe *macacus rhésus*, il lui confère après une maladie plus ou moins apparente, jamais mortelle, une solide immunité. Cette dernière propriété a immédiatement orienté les recherches en vue de la vaccination humaine sur l'emploi de cette souche.

Elle fut d'abord inoculée simultanément avec l'antisérum humain puis seule après 238 passages sur cerveau de souris. Les résultats de la vaccination furent forts satisfaisants. En 1939 Peltier [85] proposa la vaccination des populations noires com-

binée ou non avec la vaccine. La méthode fut d'autant plus largement utilisée que les circonstances en vinrent rapidement à exiger une action rigoureuse et massive.

Vaccin de l'Institut Pasteur de Dakar [52].

Le virus est représenté par du cerveau de souris lyophilisé du 258°, 259°, 260° passages. Il est dilué au moment de l'emploi dans 4 cc de sérum physiologique et inoculé à raison de 0,03 cc en intracérébrale. Les souris sont observées attentivement, seules celles qui sont paralysées mais vivantes le 4° et le 5° jour seront utilisées. Elles sont sacrifiées au chloroforme et le cerveau prélevé stérilement, puis desséché sous vide à — 20° C. La dessiccation est complète au bout de 5 à 6 jours.

Les cerveaux subissent ensuite plusieurs broyages dont un en présence de célite (0,25 gr. de Céliste pour 3 cerveaux). La poudre doit être une poussière impalpable: c'est le vaccin définitif, que l'on conditionne à raison de 1/10 de cerveau par ampoule (100 doses).

La conservation se fait à + 4° C et peut durer 2 mois.

Au moment de l'emploi le contenu d'une ampoule est versé dans un mortier et mélangé à 2 cc de solution de gomme arabique au 1/3 dans de l'eau phosphatée ajustée à pH = 7,2.

La vaccination est pratiquée à l'aide d'un vaccinostyle à la face externe du bras. A quelques centimètres l'une de l'autre on dépose 3 gouttes de suspension et l'on fait 3 scarifications à travers chacune des gouttes.

Vaccin de Sellards-Laigret [94].

Le cerveau de souris prélevé est immergé pendant 24 heures à + 20° C dans de la glycérine, puis trituré en présence de 1,25 gr de Phosphates. Après dessiccation pendant 24 heures à + 5° C on le triture de nouveau et on l'incorpore dans 4 cc de jaune d'œuf frais. Après une nouvelle dessiccation on le broie, on tamise et finalement on a le vaccin qui se présente sous forme d'une poudre jaune que l'on répartit en ampoules à raison de 0,05 gr, ce qui représente la dose nécessaire pour une vaccination. Le vaccin ainsi obtenu se conserve un mois à — 5° C. Au moment de l'emploi, cette poudre est mise en solution dans 1 cc d'eau stérile.

La vaccination comporte une injection sous-cutanée que l'on fait dans la région de l'épaule.

Les résultats de vaccination obtenus par ces deux méthodes sont satisfaisants. On n'observe aucune réaction locale. Les réactions générales, lorsqu'elles se produisent apparaissent vers le 5^e ou le 6^e jour. Elles se traduisent par une poussée fébrile accompagnée de céphalée et de courbature qui durent habituellement de 12 à 24 heures.

D'une façon générale les réactions sont moins fréquentes avec la vaccination par scarifications qu'avec la vaccination par voie sous-cutanée.

D. — MALADIE DE CARRÉ.

Green, en 1939, montre qu'après quelques passages en série pratiqués sur le furet ou le vison, le virus de Carré voit son pouvoir pathogène diminuer progressivement pour le chien et le renard au point de devenir inoffensif pour ces deux espèces au delà du 50^e passage.

Le virus inoculé à ces animaux les immunise solidement contre des doses massives de virus hautement virulent.

Reprenant l'étude du virus de la Maladie de Carré chez le furet, Goret et Coll [47] obtiennent comme Green, par passages successifs sur cet animal, à partir d'un virus des rues du chien, un virus fixe très pathogène pour le furet, mais capable de conférer une immunité solide au chien. En outre, Goret observe encore, contrairement au fait souligné par Green en Amérique, la réexaltation sur le chien en France du virus-furet américain, après passages sur les furets français [47].

Quoi qu'il en soit le virus furet est largement utilisé dans la pratique.

Les furets devant servir à la production du virus sont inoculés. Les premiers symptômes de maladie chez ces animaux apparaissent d'une façon constante après 7 jours d'incubation. La maladie évolue brutalement et la mort survient au bout de 8 à 9 jours. A la période agonique les furets sont sacrifiés :

La rate est prélevée aseptiquement, broyée finement dans un mortier puis émulsionnée à 5 % dans une solution stérile de sulfate de soude à 39,2 0/00. L'émulsion obtenue est répartie à raison de 0,2 cc par ampoule (10 mlgr de virus) et enfin lyophilisée.

Au moment de l'emploi le virus peut être incorporé dans du sérum physiologique ou dans une substance retard (substosan).

Les accidents post-vaccinaux sont assez nombreux et sont surtout à craindre quand les sujets sont dans de mauvaises conditions hygiéniques.

Ce vaccin est d'une activité remarquable, l'immunité qu'il confère apparaît dans les 24 à 48 heures et dure de 18 à 30 mois.

Il y a là un exemple classique du phénomène d'interférence. Green fait l'expérience suivante : il injecte le virus-furet en même temps que le virus virulent de Carré, les chiens sont protégés. Green va même plus loin et prouve que le virus adapté au furet guérit les chiens au premier stade de la maladie de Carré.

E. — PESTE ÉQUINE.

L'injection intracérébrale chez la souris du virus de la peste équine permet d'obtenir un virus neurotrope pouvant servir à la fabrication du vaccin.

Les expériences faites par Nieschultz montrent que la virulence du virus augmente pour la souris avec les passages, alors qu'elle s'atténue progressivement pour le cheval et le mulet. Après 20 passages intracérébraux le virus tue régulièrement la souris en 6 jours. Les équidés inoculés avec ce virus, qu'ils réagissent ou non à l'infection sont solidement immunisés. Si on injecte dans le cerveau du cheval un virus ayant subi 158 passages sur souris on ne constate qu'une réaction modérée, sans encéphalite spécifique, et il s'établit une forte immunité (Alexander [5]).

Les souris inoculées en intracérébrale sont sacrifiées à la période agonique. Le cerveau est prélevé, finement broyé et émulsionné à 1 % dans une solution d'eau physiologique additionnée d'éther (2 %) comme agent conservateur.

Le vaccin ainsi obtenu est instable et doit être utilisé le plus tôt possible après sa fabrication. La dose à injecter est de 10 cc par animal en sous-cutané. On peut associer plusieurs souches du virus et les injecter simultanément, l'immunité est solide pour chacune d'elles.

En général l'immunité que confère ce vaccin est bonne mais les accidents sont nombreux, ils tiennent soit à une réaction

post-vaccinale intense, soit à un échec total de la vaccination.

Le virus de la peste équine a pu également être adapté au cerveau de cobaye, ses valeurs immunisantes sont comparables à celles du virus cerveau de souris.

F. — PESTE BOVINE.

Virus de la peste bovine atténué par passages en série sur la chèvre

Les passages successifs du virus de la peste bovine par l'organisme de la chèvre entraînent l'atténuation de ce virus pour l'organisme du bœuf.

C'est Schein [93] qui le premier réalisa la possibilité d'atténuer le virus de la peste bovine sur la chèvre pour l'immunisation du buffle et du bœuf par séro-infection. Les premières constatations précises sur ce sujet sont dues à Edwards [26]. Cet auteur, en 1926, dans ses essais, transmet difficilement la peste bovine à la chèvre, qui dans certains cas, ne contractait qu'une maladie bénigne, presque inapparente. Ce n'est qu'après des passages répétés qu'il put infecter avec certitude et produire une maladie sévère.

Au début le matériel vaccinant était constitué par le sang des chèvres inoculées et qui étaient sacrifiées à l'acmé thermique; mais bientôt le sang fut remplacé par la pulpe splénique qui donna des résultats bien supérieurs.

D'une manière générale, les passages par l'organisme de la chèvre entraînent une atténuation moindre pour le buffle que pour le bœuf.

Lors des passages successifs, on doit s'assurer que les chèvres destinées à être inoculées ne sont pas atteintes d'infection à hématozoaires ou de mélitococcie. Il est recommandable d'effectuer les passages sur des chèvres appartenant à une race relativement sensible au virus.

L'affaiblissement du pouvoir pathogène du virus à l'égard des bovidés offre une certaine stabilité à partir du 60^e passage environ; à partir du 80^e passage, l'atténuation est assez accusée pour qu'on puisse employer le virus à l'immunisation de bovidés peu sensibles à la peste. Lorsqu'on poursuit les passages, l'affaiblissement du pouvoir pathogène augmente jusqu'au 200^e passage, après cela, il ne se produit pas de modification sensible.

Mais alors en passant le virus porté à ce degré d'atténuation sur des chèvres de moindre sensibilité, on peut obtenir un nouvel affaiblissement de son pouvoir pathogène. C'est dans la gamme des virus ainsi réalisable que l'on choisit celui qui convient au type de bovidés à vacciner.

Les chèvres généralement âgées de 6 à 8 mois sont inoculées avec le virus ; 4 à 6 jours après l'inoculation, à la période de la réaction thermique, elles sont sacrifiées par saignée totale. La rate est alors prélevée, déséchée rapidement dans le vide et conservée dans un réfrigérant ; c'est elle qui servira à l'immunisation des bovins.

Le virus est reconstitué par l'addition d'une solution saline physiologique immédiatement avant l'emploi.

Ce virus est relativement bon marché, chaque chèvre produisant au moins 1.000 doses de vaccin (Un gramme de rate est suffisant pour vacciner 250 bovins ; 0,004 gr par bovin).

L'immunité que ce vaccin confère s'établit dans les 24 heures, elle est complète au bout de 48 heures et persiste pendant 14 mois au moins [73]. Les heureux effets obtenus dans les foyers de peste spontanée, permettent de penser que le vaccin capripestique possède une certaine valeur curative, attribuée surtout à la précocité de l'immunité qu'il confère.

L'inconvénient est, que ce vaccin détermine une réaction forte. On a pu constater jusqu'à 1 % de mortalité après la vaccination. Chez les espèces très sensibles à la peste il doit être utilisé avec du sérum homologue, ce qui rend la vaccination très onéreuse.

Le virus de la peste bovine caprinisé a été employé sur une grande échelle comme agent vaccinant dans au moins trois contrées tropicales, l'Inde, le Kenya et la Birmanie. Dans l'Est Africain, il est connu sous le nom de K.A.G. (Kabete Attenuated Goat) et son usage extensif a été l'arme principale dans l'éradication presque totale de la peste bovine.

*Virus de la peste bovine atténué par passages alternés
sur le lapin*

Le lapin est sensible au virus de la peste bovine ; Nicolle et Adil Bey [81] pensaient que le virus se conservait simplement dans le cerveau de ce rongeur. En réalité l'inoculation virulente entraîne chez lui la multiplication du virus, mais, au cours des premiers passages, l'infection se développe souvent sous forme

inapparente ou ne se traduit que par une poussée thermique brève (Edwards, Jacotot). Pour favoriser l'adaptation du virus au lapin, Baker [7] alterne pendant quelque temps, passages sur lapin et passages sur bovidés. Au cours de ces passages alternés, le troisième veau inoculé fournit un virus susceptible de s'adapter à l'organisme du lapin et de s'y propager en série. La preuve de cette adaptation est fournie par la réaction thermique et l'aptitude qu'acquiert le virus à provoquer, chez le lapin des lésions nécrotiques spécifiques au niveau des formations lymphoïdes de l'intestin. Ces lésions sont d'abord faibles, mais se développent au cours des passages successifs, d'autre part on décèle le virus dans la rate et le sang du lapin qui fréquemment meurt du fait de l'inoculation. Inversement, ces passages ont pour effet d'affaiblir le pouvoir pathogène du virus pour le bœuf ce qui permet de l'utiliser comme vaccin.

En pratique on commence à adapter le virus de la peste bovine à l'organisme du lapin par une série de passages alternés lapin-veau-lapin ; cette adaptation est plus ou moins rapide selon la race de lapin et la souche du virus employées. Cela fait, on effectue, de lapin à lapin, autant de passages qu'il est nécessaire pour amener le virus au degré d'atténuation désiré. Pour arriver à bonne fin il peut être nécessaire de pratiquer des centaines de passages.

La souche Nakamura III du virus de la peste bovine après 800 passages sur le lapin ne détermine plus aucun symptôme sur le bétail, mais crée une bonne immunité.

Les lapins inoculés sont saignés au cours de la poussée thermique. Le matériel virulent est constitué par une suspension de pulpe splénique et de ganglions lymphatiques dans le sang déфибрiné et étendu dans 24 parties d'eau physiologique.

Les avantages du virus lapinisé sont nombreux [17]. Il est peu coûteux à préparer ; un lapin de 2 kg. peut fournir 500 à 600 doses de vaccin pour le bœuf. Il est facile à titrer. Il détermine une immunité qui s'installe rapidement d'où il peut être employé pour la lutte contre un foyer déclaré. (L'immunité dure au moins 14 mois). Des milliers de doses peuvent être conservées sous un petit volume. Il ne produit qu'une faible réaction chez le bovin, sans influence sur la production lactée et sans danger pour la gestation, c'est pourquoi on lui donnera la préférence pour la vaccination des espèces bovines très sensibles à l'inoculation du virus capripéste.

Ce vaccin peut être lyophilisé et conservé au frigidaire pendant 14 à 18 mois, date à laquelle son pouvoir antigène commence à baisser [88].

G. — PESTE PORCINE.

Virus de la peste porcine atténué par passages alternés sur le lapin

Baker [8] inocule à des lapins par voie intraveineuse la souche A du virus de la peste porcine après l'avoir préalablement cultivé sur le testicule du porc. Les lapins sont sacrifiés le cinquième jour, les rates prélevées et la pulpe splénique inoculée à des porcs.

La rate prélevée chez ceux-ci à l'acmé thermique servira à inoculer d'autres lapins. Après 6 passages alternatifs lapin-porc-lapin, le virus a pu être passé en série sur le lapin. Ces passages en série sur le lapin déterminent une diminution de la virulence du virus pour les porcs, et, lorsque ceux-ci reçoivent une suspension de rate provenant du 10^e et du 15^e passage sur le lapin, on ne constate chez eux qu'une faible réaction thermique, tandis qu'ils acquièrent une immunité complète contre une inoculation intramusculaire sévère de virus actif.

Koprowski, James et Cox [62] en se servant de leur souche de laboratoire l'ont adaptée au lapin par passages tour à tour sur lapins et sur porcs. Les lapins étaient sacrifiés le troisième et les porcs le cinquième jour. Quoique Baker n'ait pas constaté de réaction thermique chez les lapins lors des premiers passages, Koprowski, James et Cox se sont servis des courbes thermiques pour choisir les lapins à sacrifier. Ils remarquèrent en effet que le passage du virus de la peste porcine sur le lapin ne se traduit que par une élévation thermique nécessitant une prise de température toutes les 4 heures.

La virulence des souches après 180 à 200 passages sur lapins est nulle pour le porc. Une souche adaptée au lapin n'augmente pas en virulence après quelques passages sur les porcs.

Le virus lapinisé donne chez les porcs une immunité excellente durant au moins un an. Le matériel vaccinant est constitué par une émulsion de rate et de ganglions lymphatiques que l'on peut lyophiliser.

Chez les porcs en bonne santé le virus n'occasionne qu'une

légère réaction souvent inapparente, mais chez les porcs malades l'inoculation peut entraîner la mort ; c'est pour prévenir les accidents de ce genre que l'on associe du sérum homologue au vaccin. La dose de vaccin à injecter est de 2 cc par porc en intramusculaire.

H. — MALADIE DE NEWCASTLE.

Les travaux de Haddow, Idnani [48] et de Perumal, Pillai [86] mettent en évidence que le virus de Newcastle après 6 passages intracérébraux chez des jeunes canards est inoffensif pour la poule mais qu'il lui confère une immunité solide. Les poules inoculées avec la matière cérébrale du 6^e ou 8^e passages supportent 10.000 doses minimas mortelles d'un virus actif.

Des canetons de 1 à 10 jours sont utilisés comme producteurs de virus et sont inoculés en intracérébrale. Lorsque les symptômes encéphalitiques ont apparu les canetons sont sacrifiés, le cerveau prélevé, émulsionné à l'aide de billes de verre en présence d'une solution tampon puis lyophilisé.

Ce vaccin a été largement utilisé aux Philippines où il a donné entière satisfaction.

Le virus de la maladie de Newcastle cultivé sur le cerveau du hamster s'atténue et permet l'obtention d'un vaccin efficace dans la lutte contre cette maladie.

IV. — Avantages et inconvénients de la culture des virus in vivo.

La culture in vivo a été pendant longtemps la seule méthode d'étude des ultravirus et des maladies qu'ils provoquent. Ces techniques sont encore très utilisées de nos jours et elles reprennent même, actuellement, un essor considérable.

Dans bien des cas les virus sont caractérisés par la nature des lésions histopathologiques qu'ils déterminent et l'existence des lésions spécifiques qui en signent la nature (aphtes lors de fièvre aphteuse, ulcérations lors de peste bovine, corps de Négri lors de rage). Mais il peut arriver que l'examen histologique permette d'attribuer une maladie à un virus sans que ces lésions aient un caractère suffisamment spécifique pour permettre de désigner au seul aspect microscopique, le virus qui les cause.

Dans ce cas d'autres méthodes sont à employer pour compléter ou confirmer le diagnostic posé par les lésions histologiques. On a alors recours le plus souvent à la culture du virus *in vivo* et c'est là que les petits animaux de laboratoire sont d'un précieux usage. Un virus une fois isolé et transmis en série, sera essayé pour être identifié sur plusieurs espèces animales ou par plusieurs méthodes d'inoculation. Il peut dans certains cas, être très important de déterminer quelles sont les espèces sensibles au virus.

Une des méthodes les plus courantes pour caractériser un virus isolé consiste à inoculer ce virus à des animaux préalablement immunisés par un sérum spécifique ou par vaccination avec un virus connu.

Les titrages des virus se font également le plus souvent sur des petites espèces de laboratoire qui sont en général d'une grande sensibilité. Dans ce but on inocule à de petits groupes d'animaux, de souris par exemple, des dilutions progressives renfermant des quantités dégressives de virus (ou du produit) étudié, puis on observe la mortalité sur chaque groupe correspondant à une dilution donnée. Mais pour être statistiquement valables, les observations doivent porter sur un nombre aussi grand que possible d'animaux. Des méthodes de calcul permettant d'augmenter le nombre des animaux intervenant dans le titrage ont été établies (Totaux cumulatifs de Reed et Muench).

Enfin comme nous venons de le voir la méthode de culture des ultravirus *in vivo* a rendu de précieux services dans la lutte contre les maladies et ce chapitre n'est pas encore clos.

Récemment les travaux de Blanc et Martin puis de Goret [46, 15, 74, 75] ont mis en évidence l'adaptation du virus poliomyélitique et du virus de Carré au lapin.

L'adaptation du virus de la peste porcine au hérisson a également été obtenue.

L'emploi des animaux pour la culture des ultravirus offre des inconvénients non négligeables. La concentration du virus est souvent faible ; les chances de contamination par les bactéries ou autres virus sont grandes ; il est en effet extrêmement difficile d'obtenir un virus qui soit bactériologiquement pur, il y a des risques d'infection croisée et quelquefois des dangers d'infection humaine. D'autre part les petits rongeurs peuvent être atteints d'infections inapparentes à virus, ce qui cause beaucoup de confusion dans le travail.

DEUXIEME PARTIE

CULTURE DES ULTRAVIRUS IN OVO

I. — Généralités.

Cette méthode d'une élégance raffinée est due à Goodpasture, Woodruff et Buddingh [45]. Ces auteurs cultivèrent le virus vaccinal sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf en incubation.

La méthode se généralisa rapidement et différentes voies d'inoculation furent proposées pour atteindre les milieux de l'œuf (liquide amniotique, sac vitellin, embryon, etc...).

Cette technique est applicable à la culture de nombreux ultravirus ; la voie d'inoculation, l'âge des embryons et la température d'incubation, varient dans leur optimum avec chacun d'eux.

Il est parfois difficile d'adapter le virus au cours du premier ensemencement. Des passages alternés, avec retour à l'animal sont alors nécessaires. Les échecs sont nombreux et il convient de reprendre maintes fois les essais.

La technique peut même être considérée, dans certains cas, comme une méthode expérimentale du diagnostic et se substitue à l'inoculation aux animaux pour la mise en évidence d'un ultravirus dans un processus infectieux. C'est ainsi que l'inoculation aux animaux de laboratoire échoue avec les virus de la lumpy-skin disease des bovins et de la dermatite du cheval, alors que la culture dans l'œuf est facilement obtenue (Van der End ; W mc Intyre).

La source de virus ainsi réalisée est souvent importante et suffisante pour la préparation de vaccins ; le pouvoir immunigène est, dans la règle, bien conservé.

Par passages dans l'œuf embryonné comme par passages successifs sur animaux surviennent cependant des modifications zoologiques et tissulaires. Ces modifications peuvent entraîner une

diminution de la virulence de l'ultragerme vis-à-vis d'une espèce considérée et le virus-œuf peut être utilisé comme vaccin. Il n'en est pas toujours ainsi et parfois la virulence s'exalte par passages dans l'œuf (encéphalomyélite du cheval).

Seules certaines souches de virus se montrent adaptables à l'œuf et parmi celles-ci quelques-unes seulement se modifient.

Selon les cas la membrane chorio-allantoïdienne seule, l'embryon, voire l'œuf tout entier sont utilisés comme source de virus.

II. — Technique de la culture in ovo.

A. — PROVENANCE DES ŒUFS

Il est nécessaire d'avoir un approvisionnement régulier d'œufs, provenant d'une même race de poules. Il faut éviter d'employer des œufs à coquille foncée dont le mirage est difficile et le repérage de l'embryon malaisé. Les poules qui fournissent les œufs doivent être saines. Il est préférable d'avoir une grande régularité dans la taille des œufs. Ils doivent être propres mais non lavés : le lavage de l'œuf ayant pour effet de faire pénétrer dans les pores de la coquille des microbes qui se développeraient ultérieurement. Les œufs fécondés doivent être utilisés et mis en incubation dans les dix jours qui suivent la ponte et gardés pendant ce temps entre 2° et 20° C.

B. — INCUBATION PRÉLIMINAIRE

L'incubation préliminaire doit être faite dans un incubateur, avec un contrôle électrique de la température, comportant une circulation d'air et un dispositif avec lequel les œufs doivent être tournés automatiquement. La température d'incubation la meilleure varie de 37°3 à 37°8 C.

D'après Beveridge et Burnet, il y a avantage à faire varier le taux d'humidité entre 40 et 70 %, en le réduisant pour les inoculations dans la cavité chorio-allantoïdienne (afin d'augmenter le volume de la poche d'air) et en l'augmentant pour les inoculations intraamniotiques (pour éviter la déshydratation de l'œuf).

La position donnée à l'œuf pendant l'incubation détermine la position de l'embryon dans l'œuf et permet ainsi de l'orienter à volonté suivant le mode d'inoculation que l'on désire pratiquer.

Les œufs sont habituellement incubés avec l'extrémité de la chambre à air en haut et font un angle de 30° avec la perpendiculaire. Les œufs sont retournés 2 fois par jour jusqu'à l'inoculation. L'angle de 30° est toujours conservé.

Dans le cas d'inoculation intracérébrale les œufs sont incubés horizontalement ; ils seront tournés par une rotation d'environ 90° ; si on les tourne de 180° il en résulte une mortalité élevée.

C. — LE MIRAGE

Le mirage a pour but d'éliminer les œufs non fécondés, de s'assurer que les embryons sont bien vivants, de localiser la position de l'embryon et de la chambre à air en rapport avec la coquille, ainsi que la position de la veine allantoïque, soit dans le but de pratiquer une injection intraveineuse, soit au contraire, pour l'éviter à l'ouverture. On doit également noter l'étendue du développement de la chorio-allantoïde ; ceci pour choisir l'endroit d'inoculation de la membrane.

Le procédé le plus usité pour mirer les œufs consiste à se servir d'une lampe électrique de 100 watts placée dans un petit cylindre en bois, avec une ouverture ovale sur l'un des côtés. L'ouverture est bordée d'un caoutchouc mousse pour permettre à l'œuf de s'adapter commodément et de bloquer toute la lumière directe. L'œuf est examiné dans une chambre noire.

D. — MATÉRIEL

Un tour de dentiste est nécessaire pour faire une ouverture dans la coquille par les techniques standard. Un disque vulcanisé de carborandum convient dans ce cas.

Pour les types plus simples d'inoculation, un ciseau rond en acier suffit.

Un support approprié : un bloc de bois dans lequel est aménagée une cavité ovoïde qui permet d'y placer l'œuf, son grand axe étant horizontal.

Une aiguille droite, triangulaire, à bords tranchants, montée sur un manche, pour retirer la coquille au niveau de l'espace foré.

Des pipettes Pasteur stériles, graduées à 0,05 cc.

Des aiguilles hypodermiques, des seringues graduées à 0,05 cc.

Il faudra opérer de préférence dans une pièce aménagée et stérile.

Les dilutions de virus utilisées pour lesensemencements sont soumises à un contrôle bactériologique préalable, et lorsqu'elles sont souillées il faut les débarrasser des germes par la filtration ou les antibiotiques.

E. — MÉTHODE DES INOCULATIONS

Les œufs amenés au degré d'incubation voulu, mirés et repérés, sont choisis pour l'inoculation.

L'œuf est placé sur le support. Les portions de coquille qui seront ouvertes sont badigeonnées à l'alcool ou à l'alcool iodé. La coquille est alors entamée en un point suivant le mode d'inoculation désiré. Mais avec n'importe quel type de forage, il faut prendre soin de ne pénétrer que la coquille et éviter d'endommager les membranes qui sont au-dessous. Si la technique est pratiquée correctement, on ne doit pas faire saigner l'embryon.

1. MÉTHODE D'INOCULATION DE LA CHORIO-ALLANTOÏDE.

a. — *Mirage et forage*

Des œufs incubés de 9 à 12 jours sont employés.

Les œufs sont mirés et les limites de la chambre à air sont marquées avec un crayon. Un triangle équilatéral d'environ 12 mm de côté est dessiné sur la paroi de l'œuf où la chorio-allantoïde est la plus développée.

L'œuf est tenu horizontalement. On pratique un petit trou de façon à mettre la chambre à air en communication avec la pression atmosphérique. L'ouverture principale est alors faite au niveau du triangle.

b. — *Inoculation*

Les œufs doivent être inoculés une heure au plus après le forage.

A l'aide d'une aiguille montée on pratique une fente dans la membrane coquillère ; on aperçoit alors la membrane chorio-allantoïde et ses vaisseaux. L'inoculation se fait en déposant à la seringue ou à la pipette Pasteur une goutte (0,05 cm³) de l'inoculum.

On obture les trous faits sur la coquille avec une lamelle que l'on lute avec un mélange paraffine-vaseline.

Après l'inoculation les œufs ne doivent être ni tournés, ni remués, ils sont maintenus dans une position horizontale et emportés immédiatement à l'étuve à la température choisie pour le développement du virus inoculé.

La récolte se fait habituellement au bout de deux ou trois jours.

2. MÉTHODE D'INOCULATION DE LA CAVITÉ ALLANTOIQUE.

Mirage, forage et inoculation

Les œufs sont employés habituellement après 10 à 11 jours d'incubation. Ils sont mirés et on marque d'un point l'endroit où la chorio-allantoïde est bien développée mais libre de tous gros vaisseaux.

On fore une rainure d'environ 3 mm de diamètre en évitant de léser la membrane coquillère.

Pour effectuer l'inoculation on se sert d'une aiguille hypodermique avec laquelle on traverse la membrane coquillère et la chorio-allantoïde de quelques millimètres, l'on injecte alors 0,05 cc de l'inoculum à l'intérieur de l'allantoïde. On obture le trou par une couche de paraffine fondue.

3. MÉTHODE D'INOCULATION DE LA CAVITÉ AMNIOTIQUE.

Certains virus, notamment le virus grippal et le virus ourlien nécessitent lors de l'isolement et des premiers passages l'inoculation intraamniotique pour réussir plus sûrement.

On opère avec des œufs de 8 à 14 jours.

Méthode de Hirst

Pour les embryons de moins de 11 jours, avec un bon éclairage on arrive à les localiser par leurs yeux. Quand ceci n'est pas possible, on repère le point où la veine allantoïque s'élève. Ce point

est tout près de la chambre à air. L'embryon se trouve immédiatement au-dessous de ce point. On perfore la coquille à ce niveau. On enfonce une aiguille à travers la chambre à air en direction de l'embryon jusqu'à rencontre de celui-ci. On pousse alors l'injection. Le trou dans la coquille est refermé à la paraffine et l'œuf est miré 2 fois par jour pour s'assurer de la vitalité de l'embryon

Méthode simplifiée de Beveridge et Burnet

On ouvre la coquille comme pour l'inoculation de la chorio-allantoïde, puis on fait une ouverture à travers la membrane coquillière et la chorio-allantoïde, qui permet de voir l'embryon. On saisit l'amnios avec une pince et on inocule avec une pipette pointue.

4. MÉTHODE D'INOCULATION DU SAC VITELLIN.

On emploie généralement les œufs après 5 à 6 jours d'incubation. Les œufs sont mirés afin de déterminer si les embryons sont vivants. On pratique un forage de 3 mm sur le gros pôle de l'œuf. La membrane coquillière est laissée intacte.

L'inoculation est faite avec une seringue et une aiguille hypodermique très fine que l'on enfonce dans le grand axe de l'œuf jusqu'au centre de celui-ci. L'ouverture de la coquille est obturée avec de la paraffine. La quantité de virus obtenue est plus élevée que dans les méthodes précédentes.

5. MÉTHODE D'INOCULATION PAR VOIE INTRA-VEINEUSE.

On choisit des embryons de 10 à 11 jours.

Au mirage, il faut repérer la veine allantoïque. On fore sur son trajet un trou de 1 cm de diamètre environ. Une goutte d'huile minérale stérile est déposée sur la membrane coquillière afin de la rendre transparente. Il est important d'inoculer dans le sens de la circulation sinon des hémorragies sont possibles. L'injection est faite à l'aide d'une aiguille intradermique de 4/10 et une seringue à tuberculine. Il faut retirer l'aiguille lentement sans faire saigner l'embryon. On injecte en principe 0.05 cc de produit virulent.

6. MÉTHODE D'INOCULATION PAR VOIE INTRACÉRÉBRALE.

Cette méthode a été employée pour la culture du virus rabique.

On emploie à cet usage des embryons de 8 à 13 jours.

Les œufs sont mirés et ouverts comme pour l'inoculation par voie amniotique selon la méthode de Beveridge et Burnet. On repère la tête de l'embryon et d'un petit coup net on fait pénétrer l'aiguille dans la boîte crânienne. 10 à 30 % des embryons succombent à cette inoculation.

III. — Facteurs influençant la sensibilité de l'embryon vis-à-vis des virus.

La voie d'inoculation, l'âge de l'embryon au moment de l'inoculation, la température de l'incubation expérimentale peuvent influencer séparément le développement des virus. Il y a des indications qui prouvent que la nutrition des poules pondeuses peut affecter la susceptibilité de l'embryon à l'infection et certaines variations saisonnières observées peuvent être dues à la même cause.

Il est utile de connaître les facteurs affectant la sensibilité de l'embryon à l'infection par les ultravirus pour obtenir la propagation de ceux qui, jusqu'à ce jour, n'ont pas réussi à se multiplier dans l'œuf incubé d'une façon satisfaisante.

A. — VOIE D'INOCULATION.

Parmi les facteurs déterminant la sensibilité de l'embryon à un virus donné, le choix de la voie d'inoculation est probablement un des plus importants.

Il est évident que les virus, dans l'embryon affectent les cellules identiques à celles qui sont atteintes dans l'hôte naturel. Ce tropisme cellulaire est cependant moins marqué dans l'embryon.

En général on peut noter que chez le jeune embryon la totalité des cellules est sensible à l'infection du virus ; chez l'embryon plus âgé la spécificité du tissu devient plus nette.

Les virus de la peste aviaire, de la maladie de Newcastle, de

l'encéphalomyélite équine orientale, occidentale, et du Venezuela et la pseudo-rage peuvent être inoculés par n'importe quelle voie et produisent des infections fatales.

B. TEMPÉRATURE DE L'INCUBATION.

a) *Température de l'incubation avant l'inoculation*

Béveridge [13] constata que les embryons ayant été incubés à 36°7 et 37°5 étaient plus sensibles à l'infection par les virus A et B de la grippe inoculés dans la cavité allantoïque, que ceux incubés à 38°6 et 39° C. Les œufs inoculés dans l'amnios ou le sac vitellin et dont la température d'incubation préliminaire avait été de 37° ou 39° ne présentèrent pas de différence.

b) *Température de l'incubation après l'inoculation*

Burnet et Lush [19] constatèrent que le virus de l'ectromélie inoculé sur la chorio-allantoïde ne produisait pas de lésions visibles et se multipliait peu lorsque les œufs étaient incubés à 39°, mais qu'à 35-37° les lésions étaient bien développées et les embryons mourraient habituellement le 4^e ou le 5^e jour. Beveridge (1936 et 1938) [13] expérimentant avec une souche adaptée à l'œuf du virus grippal A, inoculée sur la chorio-allantoïde, s'aperçut que celle-ci produisait un plus grand nombre de lésions et tuait l'embryon plus rapidement lorsque l'incubation était faite à 36-37° que lorsqu'elle était faite à 39°5. Les virus de la vaccine et de la variole cultivés sur chorio-allantoïde à 28° C développent peu de lésions, tandis qu'à 37° C celles-ci sont importantes. Nelson signale [82] qu'il a obtenu une multiplication identique de ces virus à 29° et 37° C.

Sigurdsson [95] inocule le virus de la stomatite vésiculeuse sur la chorio-allantoïde : A 35-36° tous les embryons de 10 jours meurent d'infection, tandis que plus de la moitié survivent à 39-40°. A 35-36° le titre du virus est 100 fois plus élevé que lorsque les œufs sont incubés à 39-40°.

Miller [79] cultivant le virus grippal A, constata que le titre maximum de celui-ci était atteint à 35-37° alors qu'à 33° ou 39° ce titre est considérablement abaissé.

Le virus du myxome infectieux produit des lésions plus nettes sur le chorio-allantoïde à 36° qu'à 38°5 [Lush 69]. Le virus de la peste bovine par contre peut être cultivé à 35°, 37° ou 39° mais pas à 32° (Shope, Griffiths, Jenkins).

De tous les travaux précédents il découle que les embryons de poulet sont plus sensibles à l'injection lorsqu'ils sont incubés à 35-37° C qu'à 39° C. En conséquence, il est d'usage d'incuber les œufs à une température variant entre 35° et 37° C après inoculation d'un virus.

Les températures au-dessous de 35° C n'augmentent pas la sensibilité de l'embryon mais la diminuent plutôt. Cependant Alexander [2] démontre que les embryons inoculés avec le virus de la blue tongue du monton, sont plus sensibles à celui-ci lorsqu'ils sont incubés à 32°1 que lorsqu'ils le sont à 33°6, 35° ou 38° C.

C. — AGE DE L'EMBRYON.

Le virus de l'herpès se multiplie chez les embryons incubés de 7 à 17 jours à 37° mais le meilleur développement des lésions se rencontre chez les embryons de 11 à 15 jours [Shaffer et Enders 96]. Sigurdsson [95] constata que des embryons de 7 jours inoculés par la chorio-allantoïde avec le virus de la stomatite vésiculeuse mouraient plus tôt et plus régulièrement que les embryons de 10 jours, tandis que des embryons de 12 à 13 jours survivent régulièrement [Eichhorn et Manthei 27]. Bang montra [9] que les embryons de 16 jours inoculés avec le virus de l'encéphalomyélite équine exigeaient des doses légèrement supérieures pour être inoculés ($10^{-7.5}$) que lorsqu'il s'agissait d'embryons de 10 jours ($10^{-8.2}$). Miller [79] inocula la souche PR8 du virus grippal A dans la cavité allantoïque d'embryons de 9, 10, 11 et 12 jours. La mortalité dans les 48 heures fut respectivement de 91, 72, 46 et 12 %. Les embryons de 8 jours inoculés dans la cavité amniotique avec du virus herpétique meurent en 48 heures, alors que la même souche inoculée à des embryons de 12 jours, ne les tue pas avant 4 jours au moins (Anderson [6]). Burnet et Beveridge [14] inoculèrent le virus vaccinal dans l'amnios d'embryons de 12 jours; il n'y eut pas d'infection évidente, tandis que 6 embryons de 8 jours inoculés dans les mêmes conditions furent tués en 48 heures et le mélange des liquides amniotiques titrait $3,10^{-4}$ sur chorio-allantoïde.

D. — pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE.

L'étude de l'inoculation de la souche A — PR8 du virus grippal dans le liquide allantoïque de l'œuf embryonné montre

que le virus ne peut se développer si le pH est inférieur à 6 [28].

Le pH est en rapport direct avec l'âge de l'embryon, en effet le liquide allantoïque s'acidifie au fur et à mesure du vieillissement des œufs embryonnés jusqu'à des valeurs voisines de $\text{pH} = 5,5$ incompatibles avec l'infection.

Le pH des œufs embryonnés neufs (avant inoculation) descend fortement à partir du douzième ou treizième jour. Parallèlement on constate que le pourcentage des œufs dont le liquide allantoïque est infecté, décroît de jour en jour. A 90 % à douze jours il n'est plus qu'à 7,7 % à dix-sept jours. Le fait que le pourcentage des œufs à pH allantoïque inférieur à 6, donc incompatible avec l'infection, augmente à mesure que les œufs vieillissent, explique la diminution consécutive de réceptivité des œufs à partir du dixième au douzième jour d'incubation.

La température d'incubation avant l'inoculation est aussi en rapport direct avec le pH du liquide allantoïque. Romanoff et Hayward [91] ont montré que plus la température d'incubation est élevée, plus précoce est la chute de pH du liquide allantoïque. Ceci s'explique par le fait que les embryons incubés à 39° se développent plus rapidement qu'à 37° ou 35°. Leur métabolisme est plus actif. Par suite, le pourcentage des œufs à pH allantoïque inférieur à 6 est plus important, pour un jour donné parmi les œufs incubés à 39° que parmi ceux incubés à 37° pour des œufs provenant du même élevage.

E. AUTRE FACTEUR.

Un autre facteur pouvant jouer un rôle dans la réceptivité des œufs à l'infection réside en l'augmentation, dans le liquide allantoïque des œufs embryonnés, à partir du douzième jour, d'un inhibiteur de l'hémo-agglutination produite par le virus grippal. Cette substance pourrait inhiber la fixation du virus sur la membrane chorio-allantoïdienne.

IV. — Lésions.

En général, les lésions de la chorio-allantoïde sont les plus caractéristiques ; elles montrent des inclusions de corpuscules, de types identiques à ceux produits par les mêmes virus dans les

lésions épithéliales chez leurs hôtes naturels. La fréquence relative des inclusions peut cependant varier considérablement.

Le virus de la laryngo-trachéite infectieuse produit des inclusions intra-nucléaires dans chaque cellule ectodermique infectée de la chorio-allantoïde ; mais, dans l'infection naturelle, de tels éléments sont en général très difficiles à déceler. Les virus de l'ectromélie, de la variole produisent aussi des lésions, mais plus particulièrement chez les jeunes embryons où chaque cellule infectée contient une ou plusieurs inclusions cytoplasmiques ; néanmoins les corps de Guarnieri sont rarement visibles.

Dans toutes les lésions provoquées par des virus on trouve une altération inflammatoire non spécifique du feuillet mésodermique, qui est épaissi par un œdème et une prolifération cellulaire intense. Souvent au point d'inoculation apparaît un ulcère traumatique histologique très caractéristique.

Les modifications endodermiques sont habituellement négligeables, et sont caractérisées le plus souvent par une légère hyperplasie non spécifique. Mais dans certains cas, lorsque le virus inoculé (virus variolique, virus l'ectromélie) envahit tout l'ectroderme, on observe alors des inclusions cytoplasmiques importantes au niveau de l'endoderme.

L'aspect macroscopique des membranes infectées varie considérablement d'un virus à l'autre et, avec l'expérience acquise, il est souvent possible d'identifier le virus en cause par un simple examen de la membrane chorio-allantoïde.

De ces constatations est née une méthode de titrage des virus par numération des lésions au niveau de la membrane chorio-allantoïde.

Les virus de la vaccine, de l'herpès, de l'ectromélie, de la laryngo-trancheite infectieuse, de la variole aviaire et du myxome infectieux peuvent être titrés par cette méthode avec de très bons résultats. Cependant il est nécessaire d'avoir une grande expérience pour faire les tirages par numération des lésions, car il y a des membranes portant des lésions non spécifiques. Des difficultés se présentent, provenant principalement de deux causes : Dans le premier cas, il est quelquefois difficile de dire si l'on a affaire à une opacité spécifique ou non et, dans le second, la présence de foyers secondaires peut rendre impossible la fixation du nombre exact de centres d'infection primaire.

Ces difficultés font qu'à l'heure actuelle on a tendance à délaisser cette technique pour des méthodes de titrage plus simples.

Les virus de la peste aviaire, de la maladie de Newcastle, de l'encéphalite de St Louis, de l'encéphalomyélite des équidés et de la stomatite vésiculeuse tuent l'embryon avec une telle régularité que le titrage de ces virus est actuellement fait par cette méthode, la mortalité étant prise comme critérium de l'infection.

Dans ces cas les embryons et leurs membranes présentent des lésions congestives et hémorragiques très importantes. De multiples hémorragies pétéchiales sont observées dans les muscles pectoraux ainsi que sur la peau et les viscères, tandis que le cerveau montre de grosses hémorragies et des thromboses vasculaires importantes.

Des inclusions cellulaires spécifiques du virus en cause sont très souvent observées au niveau du foie, du cerveau et des enveloppes embryonnaires.

V. — Culture des ultra-virus sur tissus greffés dans l'œuf embryonné.

La méthode fut inaugurée par Murphy et Rous [80]. Ces auteurs greffèrent après succès le sarcome de Rous sur la chorio-allantoïde de l'œuf en incubation. Murphy par le même procédé cultiva le sarcome de Jensen du rat. Stevenson greffa des tumeurs animales dans les mêmes conditions.

Depuis, un grand nombre de tissus ont pu être greffés avec succès sur la chorio-allantoïde.

Goodpasture et Anderson [41] greffèrent de la peau de poule adulte immunisée et de la peau réceptive au virus de la variole aviaire. Le virus produisit des lésions sur les deux genres de greffes. Goodpasture, Douglas et Anderson [43] greffent de minces lames de peau humaine d'adulte et d'enfant sur la chorio-allantoïde. Ces greffes prennent rapidement. Une suspension de virus herpétique ou vaccinal est déposée à la surface des lambeaux greffés 24 à 48 heures après la greffe de ceux-ci. Les virus produisent des vésicules, des pustules, des ulcérations et des inclusions typiques. Dans quelques cas, les greffes provenaient de personnes immunisées contre la vaccine; cela n'empêcha pas

ce virus de se développer. Ces mêmes auteurs [42] après avoir échoué dans la culture du virus de l'avortement épizootique des juments sur embryon de poulet par les méthodes ordinaires, greffent des lambeaux d'amnios humain sur la chorio-allantoïde puis inoculent une émulsion de foie infecté provenant de poulains issus d'avortements. Les greffes présentèrent des inclusions nucléaires typiques, ainsi que des nécroses, des ulcérations et un exsudat inflammatoire.

Le virus de l'herpès fut cultivé par la même méthode [43]. Des fragments de peau infectés par le virus, sont greffés sur la chorio-allantoïde d'embryons de 9 jours. Les greffes furent prélevées le quatrième, le sixième, le septième et le huitième jours après l'inoculation. Dans tous les cas l'infection par le virus fut décelée.

Tenbroeck [104] s'inspira de cette méthode pour cultiver le virus de la peste porcine. Constatant que ce virus ne se multipliait pas dans l'embryon de poulet, il greffa des fragments de testicules de porc inoculés au préalable avec le virus de la peste porcine, sur la chorio-allantoïde d'embryons de 10 jours. Avec ce procédé le virus fut maintenu pendant 13 passages.

Michelsen, Schjerning, Thiesen, Malmquist [78] cultivent le virus aphteux sur l'épithélium de langue de bovin transplanté sur la chorio-allantoïde. Ils ont pu réaliser par cette méthode 14 passages. Les passages alternés œuf avec tissu et œuf sans tissu sont possibles.

L'emploi de tissu étranger greffé sur l'embryon de poulet peut ouvrir un nouveau champ de recherches pour la culture des virus hautement spécifiques chez leur hôte naturel.

VI. — Application de la méthode de la culture des virus in ovo à la fabrication des vaccins.

Les virus cultivés in ovo et utilisés en vue de l'immunisation sous forme de vaccins, se classent en deux groupes : les virus-vaccins modifiés et les virus-vaccins inactivés.

A. — LES VIRUS-VACCINS MODIFIES

Les propriétés biologiques des diverses souches de virus ne sont pas uniformes. Leur pouvoir pathogène pour l'homme et les

animaux et leur puissance de diffusion sont les formes les plus importantes de ces variations. La souche de virus qui doit servir à la production du vaccin doit avoir un pouvoir antigène stable tout en perdant lors des passages sur l'œuf une partie ou la totalité de sa virulence pour l'hôte naturel. Une souche atténuée dans sa virulence doit être capable d'immuniser sans produire d'infection clinique. La difficulté est d'obtenir des souches possédant le degré voulu d'atténuation. Si l'atténuation est trop poussée, le virus ne cause aucune réaction, ni clinique, ni sérologique. Si elle ne l'est pas assez, on détermine une infection avec signes cliniques manifestes. Avec une atténuation convenable, on doit obtenir de bonnes réponses sérologiques et aucune réaction clinique ou si légère qu'il ne s'agit que d'une petite hausse de température et de simples malaises.

Les virus issus de la culture *in ovo* et employés sous forme active pour l'immunisation humaine sont les virus de la vaccine, de la fièvre jaune (souche 17 D) et de la grippe ; pour l'immunisation des animaux sont utilisés les virus : de la variole aviaire, de la peste aviaire, de la maladie de Newcastle, de la laryngo-trachéite infectieuse, de la bronchite infectieuse, de la peste bovine, de la blue tongue, de la maladie de Carré, de la rage.

1. FIÈVRE JAUNE.

Theiler et Smith [106], Smith, Penna et Paoliello [101] furent les premiers à employer pour l'immunisation humaine le virus de la fièvre jaune (souche 17 D) cultivé sur œufs incubés.

La technique utilisée est la suivante : on inocule des embryons de 7 jours ; après 3 à 4 jours de culture ceux-ci sont prélevés avec leur membrane et broyés avec du sérum humain afin de faire une suspension à 10 ou 15 %. Cette suspension est ensuite centrifugée et filtrée avant d'être utilisée comme vaccin. Le sérum humain étant à l'origine d'accidents anaphylactiques il fut remplacé par de l'eau distillée.

Ce vaccin atténué a été très largement utilisé et des recherches faites sur une grande échelle ont montré d'une manière convaincante qu'il est inoffensif et extrêmement actif pour prévenir la maladie naturelle.

2. VACCINE.

Le virus cultivé sur chorio-allantoïde est très utilisé comme vaccin.

Des embryons de 10 à 12 jours sont inoculés, 3 jours après, la chorio-allantoïde est prélevée, convenablement broyée et diluée dans une solution saline glycinée. C'est ce matériel qui servira à la vaccination.

Cette méthode est très avantageuse, un œuf permet de préparer environ 250 doses de vaccin. Le virus est obtenu débarrassé de microorganismes d'infection secondaire, on peut le titrer, le standardiser et l'utiliser immédiatement après sa préparation. Le vaccin ainsi obtenu est aussi efficace que le vaccin de génisse (Goodpasture et Coll. [44]), sa conservation est aussi bonne et la réaction post-vaccinale est généralement moins forte que celle que provoque le vaccin usuel.

3. GRIPPE.

Burnet [18] a obtenu l'atténuation de la virulence et la conservation parallèle des propriétés antigéniques de certaines souches du virus grippal par passages en série sur la membrane chorio-allantoïde.

On inocule des embryons de 11 jours incubés à 37°; ceux-ci sont ensuite placés à 35-36° pendant 2 jours. Lors du prélèvement on sectionne d'abord l'artère et la veine vitelline puis on aspire les liquides embryonnaires mélangés au sang. Les hématies adsorbent le virus; après élution de celui-ci on obtient un vaccin concentré.

Ce vaccin fut expérimenté sur une grande échelle dans la pratique par Francis, Salk, Pearson et Brown [30] et la Commission de la grippe de l'armée américaine. Les résultats furent satisfaisants.

4. MALADIE DE NEWCASTLE.

Iyer et Dobson [24, 53] par passages en série sur l'œuf embryonné de certaines souches spontanément atténuées du virus de la maladie de Newcastle constatèrent que celles-ci après un certain nombre de passages (14 à 33) devenaient avirulentes. Ces souches avianisées inoculées aux volailles les immunisent solidement contre des doses massives de virus hautement virulent.

Des œufs embryonnés de 9 à 12 jours sont inoculés sur la chorio-allantoïde. Le virus tue les embryons en 48 heures. A

cette date on recueille les liquides amniotique et allantoïdien, on les répartit en ampoules de 1 cc et on lyophilise. (Les embryons trouvés morts 24 heures après l'inoculation sont éliminés).

Le virus-vaccin ainsi obtenu peut être conservé pendant 3 à 4 mois à 5° C. Il est dilué à 1 p. 500 dans de l'eau distillée immédiatement avant l'emploi, et injecté à la dose de 0,5 cc en intra-musculaire. L'immunité apparaît après 48 heures et persiste pendant plus d'une année.

Le vaccin a été largement utilisé aux Indes, en Palestine, en Egypte et aux U.S.A. L'inconvénient est qu'il provoque des réactions sévères avec réduction de la ponte et une certaine mortalité pouvant atteindre 2,5 à 6 % chez les animaux débiles. On a signalé d'autre part que les volailles vaccinées pouvaient être infectantes.

Des méthodes comparables sont utilisées pour l'obtention des virus-vaccins modifiés de la peste aviaire et de la laryngo-tracheite infectieuse.

5. PESTE BOVINE.

La culture du virus de la peste bovine sur la membrane chorio-allantoïde d'œufs incubés a été réalisée pour la première fois par Kunert.

Shope et Coll. [54, 97, 98] montrent qu'après 8 à 12 passages sur la chorio-allantoïde, aucune atténuation du virus de la peste bovine n'est constatée, mais que celui-ci peut alors être inoculé et passé en série dans le sac vitellin. En cet endroit le virus s'atténue progressivement, encore qu'irrégulièrement pour les ruminants, par contre il envahit l'embryon et les liquides embryonnaires, dans des délais de plus en plus courts. Après quelques passages, la généralisation s'effectue en 24 ou 48 heures.

Le nombre de passages dans le sac vitellin nécessaires pour porter le virus au degré d'atténuation qui permette de l'employer comme vaccin varie selon la souche de virus et selon la sensibilité à la peste bovine des animaux auxquels on destine le vaccin.

Pour l'inoculation de la chorio-allantoïde, Shope et Coll. utilisent des œufs embryonnés de 10 jours, par contre, les passages dans le sac vitellin sont effectués sur embryons de 7 jours.

L'inoculation faite on remet les œufs à l'étuve pendant 72 heures ; ils sont ensuite placés à -20° C pendant 40 minutes, puis à $+2^{\circ}$ C jusqu'au moment du prélèvement. Les embryons avec leurs membranes et liquides sont récoltés, broyés et répartis dans des flacons de 60 cc à raison de 20 cc par flacon, et, immédiatement après, lyophilisés.

Maintenu entre $+2$ et $+5^{\circ}$ C le virus-vaccin ainsi obtenu conserve son activité pendant plus d'un an.

Pour l'usage, on met le virus en suspension en introduisant la quantité de solution tamponnée nécessaire pour faire 60 cc. Les doses à injecter lors de la vaccination sont de 0,5 cc à 2 cc.

Le virus de la peste bovine avianisé est bon marché. Un œuf peut fournir 50 à 60 doses de vaccin. L'immunité apparaît très vite et durerait 2 ans. Lors de l'inoculation on constate seulement une hausse de température brève et d'intensité variable.

6. MALADIE DE CARRÉ.

En 1948 Haïg [49] cultive sur la membrane chorio-allantoïde une souche du virus de Carré adaptée au furet ; après 30 passages en série le virus conserve encore son pouvoir léthal, puis le perd progressivement jusqu'au 90^e passage. Cabasso et Cox [20] entretiennent de la même façon un virus prélevé à l'origine sur le chien mais adapté sur la chorio-allantoïde par 4 passages alternatifs œuf-furet (souche Léderlé). Ici encore le pouvoir pathogène se conserve jusqu'au 26^e passage. Au cours des passages suivants les extraits chorio-allantoïques ne sont plus mortels pour le furet, mais offrent des propriétés vaccinales.

Des essais faits sur des chiens confirment ces résultats.

Des œufs embryonnés de 8 jours sont inoculés sur la chorio-allantoïde puis incubés à 35° pendant 4 jours. L'embryon tout entier est récolté, broyé, dilué en solution physiologique tamponnée et si nécessaire lyophilisé.

Les essais repris à Lyon par Goret, Lucam, Joubert et Coll. [66, 67] confirment les résultats des auteurs américains. En outre ces auteurs réussissent l'ovoculture du virus de l'hépatite contagieuse du chien (maladie de Rubarth). Ils font leurs expériences sur des embryons de 6 à 7 jours. La récolte est effectuée 4 jours après l'inoculation (en général les embryons sont

morts après 96 heures). Les passages sont effectués à partir d'embryons récoltés vivants ou morts. La virulence du virus prélevé sur embryons morts disparaît totalement aux environs du 29^e passage. Elle disparaît plus vite chez le virus prélevé sur embryons vivants. Mais, fait curieux, si après 33 passages en série prélevés sur embryons morts on poursuit les passages à partir d'embryons prélevés vivants la virulence réapparaît.

Il est possible que dans un proche avenir les vaccins utilisés jusqu'alors contre la maladie de Carré seront définitivement remplacés par le virus d'ovoculture qui est déjà très utilisé et donne toute satisfaction.

7. BLUE TONGUE.

Mason, Coles et Alexander [76] furent les premiers à cultiver le virus de la blue tongue du monton sur œufs embryonnés ; mais pour que la culture réussisse, les poules fournissant les œufs devaient avoir un régime carencé en riboflavine.

En 1947, Alexander, Haïg et Neitz [3, 4] isolent des souches du virus de la blue tongue qu'ils réussissent à passer en série sur l'œuf embryonné. Après un certain nombre de passages en série (variant selon les souches de 30 à 101) le virus perd sa virulence pour le mouton alors que ses propriétés antigéniques restent intactes.

Des embryons de 8, 9 ou 10 jours sont inoculés dans le sac vitellin ; après l'inoculation ils sont incubés pendant 24 heures à 35° puis 48 heures à 32°. La récolte se fait 3 jours après l'inoculation, que les embryons soit morts ou vivants. (Des résultats meilleurs seraient obtenus en incubant les œufs inoculés à 33°5 pendant 3 ou 4 jours). Les embryons sont broyés mis en suspension en solution physiologique tamponnée et lyophilisés.

Les doses à injecter sont à l'ordre de 1 à 2 cc en sous-cutané. Ce vaccin a été largement utilisé en Afrique du Sud où il a donné toute satisfaction. Cinq millions de moutons ont été vaccinés en 1953 et douze millions en 1954.

Des symptômes frustes de maladie peuvent quelquefois être observés.

8. RAGE.

Tout récemment Koprowski, Cox, Leach et Johnson [61, 64] ont isolé de la moëlle épinière d'un enfant mort de rage, un virus qui a pu être adapté à l'œuf (Souche Flury).

Après 136 passages dans le cerveau de poussins de un jour on observe une diminution de la virulence du virus et celui-ci peut être passé en série dans l'œuf embryonné.

Après 50 passages en série le virus est encore pleinement virulent quand il est injecté en intracérébrale chez la souris, le hamster et le cobaye, tandis que l'injection intramusculaire ne produit pas de signes d'infection chez le chien et le lapin.

Après 179 à 181 passages en série le virus perd son pouvoir pathogène pour la souris, le chien et le lapin tandis que le pouvoir antigène est conservé.

Tierkiel, Koprowski, Black et Gorric [59, 60, 63] ont démontré au laboratoire l'inocuité et l'efficacité du vaccin souche Flury, qui inoculé en intra-musculaire chez le chien, lui confère une excellente immunité durant au moins trois ans.

Des embryons de 7 jours sont inoculés dans le sac vitellin. Après 9 à 10 jours d'incubation les embryons sont récoltés, broyés, mis en suspension à 40 % dans une solution physiologique tamponnée, répartis en ampoules (2 gr par ampoule) et lyophilisés. Lors de l'utilisation le virus est remis en suspension dans 3 cc d'eau stérile.

L'embryo-vaccin est titré sur cobaye, car la souris est résistante.

Les essais pratiqués, faits sur une grande échelle et soigneusement contrôlés ont confirmé les résultats de laboratoire. Wells [111] décrit l'emploi de l'embryo-vaccin pour combattre une épizootie de rage en Malaisie. Plus de 100.000 chiens ont été vaccinés en 1952 et la rage fût complètement éliminée du pays dès l'été 1953. Kaplan, Goor et Tierkiel [56] signalent l'emploi du vaccin Flury pendant une période de deux ans en Israël où la rage sévit à l'état endémique depuis au moins 25 ans. Plus de 20.000 chiens ont été vaccinés et une chute rapide des cas de rage a été constatée. En Rhodésie plus de 200.000 chiens ont été vaccinés avec cette souche (Adamson [1]) ce qui permet de contrôler raisonnablement une épizootie sévère de rage.

L'embryo-vaccin est aussi très employé chez les bovins où il donne d'excellents résultats (Koprowski [58, 62]). Ce vaccin

a même été recommandé par le comité d'experts sur la rage de l'O.M.S.

Johnson [55] inocule l'embryo-vaccin à des volontaires et démontre que l'immunité conférée chez l'homme par la souche Flury est plus forte que celle obtenue par le vaccin phéniqué ou le virus fixe de Pasteur. En outre la réaction post-vaccinale est moins forte.

Une autre souche du virus rabique (Souche Kelev) a également été adaptée à l'œuf embryonné. Des essais limités, à la fois au laboratoire et dans la pratique, indiquent que ce virus confère une bonne immunité aux chiens inoculés [57]. Le vaccin est préparé à partir des embryons du 60° au 70° passage.

Le virus Flury permettrait donc d'envisager d'une façon nouvelle la vaccination et la sérothérapie antirabiques ; il est néanmoins indiqué d'en faire une étude minutieuse avant que ne soit apportée une modification aux traitements classiques de l'homme et des animaux.

B. — LES VIRUS-VACCINS INACTIVES

Les virus de culture sur œuf puis inactivés, utilisés pour l'immunisation sous forme de vaccins sont ceux de la grippe, pour l'homme et pour les animaux, ceux de la variole aviaire, de la peste aviaire, de la maladie de Newcastle, de l'encéphalomyélite infectieuse des équidés.

Pour la fabrication des virus-vaccins inactivés il est nécessaire d'obtenir une grande quantité d'antigène-virus spécifique dans la culture. Pour cela il faudra soigneusement étudier les conditions d'incubation exigées par le virus ; de plus il est essentiel d'avoir une souche bien adaptée, afin que les caractères antigènes restent inchangés.

1. ENCÉPHALOMYÉLITE INFECTIEUSE DES ÉQUIDÉS.

C'est en 1938 [11] pendant le grand développement épizootique de l'encéphalomyélite équine aux U.S.A. que fut fabriqué avec succès à l'échelle commerciale, à partir du virus cultivé in ovo, le premier vaccin contre cette maladie.

Le virus est inoculé sur la chorio-allantoïde d'embryons de 10 jours. L'infection se généralise très vite et les embryons meu-

rent 15 à 24 heures après l'inoculation. A cette date l'embryon et ses membranes est prélevé, broyé, émulsionné en eau physiologique et formolé. Le vaccin contient 10 % de tissus d'embryons infectés et 0,4 % de formol. Ce vaccin est un excellent agent immunisant, il protège les cobayes et les chevaux contre l'inoculation intracérébrale de doses mortelles multiples de virus homologue.

Au début le vaccin provenait de cultures sur embryons de 13 à 14 jours. Des cas sévères d'anaphylaxie, parfois mortels, étaient constatés chez les chevaux après vaccination. Des études faites par Berge et Hargett en 1942 démontrèrent que les vaccins fabriqués avec des embryons de 13 à 14 jours contiennent des quantités appréciables de protéines spécifiques à l'embryon et que les accidents anaphylactiques étaient dus à celles-ci.

Les vaccins inactivés contre la grippe, la variole aviaire, la peste aviaire et la maladie de Newcastle sont obtenus de la même façon.

Ces vaccins sont inactivés par le formol, le phénol ou d'autres antiseptiques et administrés avec des substances adjuvantes et stimulantes afin d'obtenir une immunité de plus longue durée.

Il semble que les antiseptiques altèrent les propriétés antigéniques des virus, d'où l'immunité que ces vaccins confèrent, est souvent insuffisante et de durée très brève, c'est pourquoi la plupart des auteurs donnent leur préférence aux virus-vaccins modifiés.

VII. — Avantages de la culture des virus in ovo.

L'emploi d'embryons de poulet offre des avantages nets sur celui des animaux de laboratoire pour le développement et la conservation des virus. L'achat des œufs est moins onéreux. L'œuf réalise d'autre part un milieu stérile et riche, dépourvu d'agents contaminants et de virus latents qui causent tant de confusion dans le travail avec les petits rongeurs.

Comme source de virus pour la fabrication de vaccins l'embryon de poulet est, dans beaucoup de cas supérieur aux animaux. Cette méthode permet d'obtenir une concentration très élevée de virus ; on a moins de chances de contamination par les bactéries ou d'autres virus. L'œuf contient généralement moins de

protéines étrangères nocives. La plupart des virus après une culture prolongée dans l'embryon de poulet perdent leur virulence pour l'hôte naturel, tout en gardant l'intégrité de leur bagage antigénique ; c'est pourquoi on peut employer ce matériel comme vaccin vivant atténué.

La culture in ovo permet également l'étude histologique des lésions produites par les virus. En général les inclusions constatées sur la chorio-allantoïde sont de type identique à celles produites par le même virus, dans les cellules de son hôte naturel. De ces constatations est née une méthode de titrage des virus par numération des lésions. Cette technique donne, pour les souches de virus appropriées, un procédé convenable et bon marché, avec une exactitude qui ne peut être égalee que par un titrage animal beaucoup plus dispendieux et plus long. L'expérience acquise, indique que les virus de l'herpès, de la vaccine de la laryngo-trachéite, de la variole aviaire et du myxome infectieux du lapin se titrent plus facilement et avec de meilleurs résultats sur la chorio-allantoïde que par aucune autre méthode. Les virus de la peste aviaire de la maladie de Newcastle, de l'encéphalite de St Louis, de l'encéphalomyélite des équidés de la stomatite vésiculeuse tuent l'embryon avec une telle régularité que le titrage de ces virus est actuellement fait par cette méthode, la mortalité étant prise comme critérium de l'infection.

La culture des virus in ovo a également beaucoup aidé la sérologie. C'est à la suite des travaux de Mc Kee, Rake, Grace et Jones en 1940, que la déviation du complément a pu être appliquée au diagnostic clinique de la lymphogranulomatose. L'antigène vitellin se montra un agent de diagnostic plus sensible et plus spécifique que l'antigène cerveau de souris.

Nigg, Henle et Chambers en 1941, signalèrent la propriété que possède le liquide allantoïque infecté de fixer le complément.

En 1941, Hirst découvrit que le liquide allantoïque infecté agglutinait les hématies de poulet. Ceci permit de mettre au point une méthode élégante et de très grande valeur pour le titrage des anticorps et de certains virus.

La culture des virus dans l'œuf embryonné a rendu de très grands services en virologie, elle a permis d'élucider un grand nombre de problèmes. Grâce à cette méthode il a été possible de fabriquer des vaccins doués d'une grande efficacité, pour lutter contre les maladies infectieuses.

TROISIEME PARTIE

CULTURE DES ULTRA-VIRUS IN VITRO

I. — Généralités.

Si la culture des virus chez l'animal est en général facile, il est difficile au contraire de multiplier les virus hors de l'organisme.

On a essayé depuis très longtemps de cultiver les ultravirus sur les milieux nutritifs employés usuellement en bactériologie, mais ce fut en vain. La présence de cellules en voie de prolifération active ou en état de survie est indispensable.

Les relations entre le virus et les cellules qu'il infecte sont tellement étroites qu'il lui est impossible de se développer en dehors de celles-ci.

Il peut paraître singulier que le virus ne puisse trouver dans les cellules mortes les éléments nutritifs qu'il puise normalement dans les cellules vivantes ; pour expliquer ce phénomène plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

L'arrêt de croissance du virus au moment de la mort de l'hôte peut être due à une modification de la constitution chimique qui provoquerait la formation de substances toxiques pour le virus.

D'autre part la prolifération du virus peut nécessiter des substances de croissance contenues dans les tissus vivants mais se détruisant rapidement après leur mort ; par exemple des produits intermédiaires du métabolisme cellulaire qui disparaissent quand celui-ci cesse.

Enfin le virus peut avoir besoin comme support du milieu colloïdal spécial qu'il trouve dans le protoplasme.

En conséquence, des succès n'ont été obtenus dans la culture des virus que lorsqu'on a réussi à conserver ou à multiplier des cellules et des tissus en dehors de l'organisme.

Harrisson, en 1907, réussit à cultiver in vitro des cellules nerveuses et des fibres musculaires de grenouille adulte.

Burrows, Carrel et Fischer mettent au point des techniques de culture de tissus sur plasma additionné d'extrait embryonnaire, ce qui permet une multiplication importante et de longue durée des cellules.

Par la suite, la culture des tissus a servi pour obtenir le développement in vitro des virus.

Steinhart, Israël et Lambert en 1913 cultivent le virus vaccinal sur cellules en voie de prolifération.

En 1924, Parker et Nye cultivent le virus vaccinal puis le virus hérépétique in vitro, sur des fragments testiculaires de lapin.

Depuis, la culture de la plupart des virus a été tentée avec succès ; des techniques nouvelles sont nées et ont permis l'obtention de quantités considérables de virus pouvant servir à la fabrication des vaccins.

II. — Techniques générales.

La culture des virus en culture de tissus fait appel aux méthodes bactériologiques, mais possède en outre des techniques qui lui sont propres.

Nous envisagerons les méthodes générales applicables à tous les cas, réservant pour un chapitre ultérieur l'étude en particulier de la culture Frenkel.

La prolifération des tissus animaux in vitro ne peut être entretenue qu'au moyen de milieux de culture susceptibles de leur fournir les éléments nutritifs nécessaires. De plus ils ne peuvent vivre et se développer qu'à l'abri de tout organisme étranger et de toute substance toxique, ce qui peut être réalisé en travaillant aseptiquement.

Enfin les cultures exigent des conditions physiques déterminées dont l'importance est fondamentale.

Nous examinerons successivement ces différents points, puis nous montrerons qu'ils nécessitent certains aménagements des laboratoires.

A. — L'ASEPSIE

On sait qu'il est relativement facile d'obtenir des cultures bactériennes stériles, en effet celles-ci se développent rapidement, résistent facilement aux contaminations accidentelles et peuvent même si cet accident se produit, être ramenées à l'état de pureté par des repiquages successifs sur des milieux sélectifs.

Au contraire, dès qu'un germe quelconque s'introduit dans une culture de tissus, il se développe beaucoup plus rapidement que cette dernière qui ne tarde pas à mourir.

Le maintien indéfini de la pureté biologique est donc une des principales difficultés de la technique des cultures de tissus. Pour réaliser cette stérilité rigoureuse, il faut partir de tissus et de milieux de culture exempts de germes microbiens et de spores de champignons.

Si cette condition n'est pas remplie, on observe une infection systématique atteignant la quasi-totalité des cultures et dont la répétition rendrait tout travail impossible. Cette infection systématique peut être évitée d'une manière complète en détruisant les germes par des moyens appropriés.

Il faut également éviter les contaminations artificielles qui peuvent se produire, par exemple par l'introduction de poussières atmosphériques dans les cultures et provoquer la perte de certaines d'entre elles. Cette infection accidentelle ne peut être empêchée totalement, mais on peut réduire sa fréquence en travaillant aseptiquement.

1. — PROCÉDÉS DE STÉRILISATION

La destruction des germes peut être réalisée par la chaleur, par les agents chimiques, par les antibiotiques ou enfin par la filtration.

L'emploi de la chaleur est limité aux récipients de culture et aux instruments. Les agents chimiques et les antibiotiques sont surtout utilisés pour aseptiser les organes ou les tissus sur lesquels s'opèrent les prélèvements. La filtration est utilisée pour la stérilisation des milieux de culture, car ceux-ci renferment des éléments thermolabiles.

a) STÉRILISATION PAR LA CHALEUR

Flambage.

On se sert à cet effet du bec Bunsen. Tous les instruments servant à la culture des tissus peuvent être flambés. Lors des repiquages ou des ensemencements les orifices des récipients seront stérilisés en les passant deux ou trois fois dans la flamme. Il est d'ailleurs recommandé de travailler continuellement en présence d'un bec Bunsen.

Stérilisation au four Pasteur ou à l'autoclave de Chamberland.

Tous les objets de verrerie ou de porcelaine, les instruments, les récipients de culture, le coton cardé, le papier, seront stérilisés par l'un ou l'autre de ces procédés.

Certains auteurs déconseillent la stérilisation de la verrerie au four Pasteur. Ce procédé a pour effet de porter celle-ci à une température sèche de 170°, ce qui alcalinise sa surface, produit un début de carbonisation du papier et du coton, entraînant ainsi la formation de substances toxiques qui sont susceptibles de compromettre le développement des cultures. La chaleur humide qui nécessite une température de 120° ne produit pas d'altération semblable.

b) STÉRILISATION PAR LES AGENTS CHIMIQUES

Les agents chimiques sont utilisés pour stériliser la surface des tissus prélevés. On les emploie aussi pour aseptiser les mains, la table de travail et les objets divers, au cours des manipulations aseptiques.

Les substances les plus employées sont des liquides volatils : alcool, éther, acétone ou des composés qui se détruisent spontanément en un temps plus ou moins long, ainsi l'eau oxygénée, la solution de Dakin et l'hypochlorite de soude ou de calcium.

c) STÉRILISATION PAR LES ANTIBIOTIQUES

Ceux-ci seront surtout additionnés aux milieux de culture. Ils seront choisis et concentrés de telle sorte qu'ils ne gênent pas la multiplication de l'ultra-virus et soient tolérés par le tissu en culture.

Les antibiotiques les plus fréquemment employés à cet usage sont la pénicilline, la streptomycine et la chloromycétine.

d) STÉRILISATION PAR LA FILTRATION

Des filtres divers (bougies, disques Seitz, verre fritté convenablement, plaques E. K.S., membranes de collodion dites « gradocol ») pourront être utilisés pour arrêter les bactéries et de ce fait stériliser les milieux de culture ou la solution de virus.

Mais il faudra veiller à ce que ceux-ci ne soient pas contaminés lors des manipulations ultérieures. D'où l'intérêt d'adjoindre toujours des antibiotiques aux milieux de culture.

2. — LE TRAVAIL ASEPTIQUE

Afin de réduire au minimum les infections accidentelles, il faudra respecter un certain nombre de règles.

Il faut en effet éviter tout courant d'air dans la pièce auxensemencements. Les portes et les fenêtres doivent être hermétiquement closes. Les opérations de mise en culture devront être pratiquées à proximité d'un bec Bunsen qui sert aussi au flambage des instruments ; le courant d'air ascendant entretenu par la flamme empêche la chute des poussières.

Les objets stériles ne doivent jamais être laissés à découvert. Les instruments chirurgicaux seront, après flambage, placés entre deux feuilles de papier stérile.

Au cours des opérations d'ensemencement, les récipients contenant des milieux de culture ne seront ouverts que pendant un temps aussi court que possible ; les tubes débouchés seront inclinés afin d'éviter la chute des poussières dans l'orifice ; celui-ci sera stérilisé par le flambage avant de le déboucher.

Il ne faudra jamais expirer ni parler au-dessus des récipients débouchés contenant des milieux de culture ou les cultures elles-mêmes. C'est pourquoi il est préférable de travailler avec une cagoule.

En outre l'opérateur devra avoir une blouse stérile et se laver fréquemment les mains avec de l'alcool à 70°.

3. — INSTALLATION DU LABORATOIRE

La réalisation des cultures des virus in vitro d'une façon stérile et dans des conditions physiques favorables, exige un aménagement particulier des laboratoires.

Un laboratoire bien outillé doit se composer de trois pièces :

l'une, destinée au travail aseptique, doit être très petite sans aucun meuble de bois, entièrement carrelée, ou, si le plancher est en bois, il doit être recouvert de linoléum qui sera fréquemment lavé mais jamais balayé à sec pour éviter de soulever les poussières.

Elle sera munie de larges paillasses sur lesquelles seront effectuées les opérations aseptiques.

L'air est filtré par un feutre huilé, l'éclairage est bien dirigé, sans rayons solaires directs. Les fenêtres seront munies de bourrelets. La salle sera stérilisée par un dispositif de tubes à rayons ultra-violets.

L'aménagement est réduit au minimum : deux tabourets et deux becs Bunsen. Aucun produit toxique ne doit être introduit dans cette pièce.

La seconde pièce servira à la conservation des cultures. Elle doit être aménagée en véritable étuve, au moyen d'un chauffage électrique réglable avec un thermostat.

Enfin, la troisième pièce sera réservée à la préparation des milieux de culture, à la stérilisation, ainsi qu'au nettoyage de la verrerie.

B. — RECIPIENTS DE CULTURE ET INSTRUMENTS

En plus des instruments et de la verrerie utilisés en bactériologie, la forme des récipients de culture, ainsi que celle des instruments servant à la mise en culture des ultravirus, varient selon les méthodes. Il serait fastidieux d'en donner ici la liste.

Un soin particulier doit être apporté au nettoyage de la verrerie servant à la culture des tissus. Elle doit être brossée dans une solution chaude à 0,5 % de savon de Marseille, bouillie en solution carbonatée ou savonneuse, puis passée dans une solution d'HCl à 10 0/00, enfin rincée à l'eau courante, puis distillée, bien égouttée et séchée, bouchée au coton cardé lorsqu'elle est à ouverture étroite (tubes, fioles erlenmeyer) recouverte de papier lorsqu'elle est à ouverture large (cristallisoirs, boîtes de Pétri, Bechers), puis stérilisée au four de Pasteur ou de préférence à l'autoclave de Chamberland.

C. — MILIEUX DE CULTURE

Les premiers auteurs qui ont cultivé des tissus animaux utilisaient des milieux renfermant simplement du plasma de poule coagulé.

Par la suite, on a remarqué que la croissance peut être améliorée par addition d'extraits embryonnaires. Puis dans le but de réaliser des cultures de virus en masse, différents milieux furent proposés ; ils se composent en général d'une solution saline de base, additionnée de plasma, sérum ultrafiltré, peptone, de différents acides aminés, selon les exigences du tissu et du virus.

1. — LES SOLUTIONS SALINES

Solution de Ringer

NaCl	6,5	gr
KCl	0,14	gr
CaCl ₂	0,12	gr
NaHCO ₃	0,20	gr

Eau distillée q.s.p. 1.000 cc.

Le liquide peut être stérilisé par filtration. Il a un pH de 6,5.

Solution de Ringer-Locke

NaCl	9	gr
KCl	0,42	gr
CaCl ₂	0,24	gr
NaHCO ₃	0,20	gr
Glucose	1,00	gr
H ₂ O	1.000	cc

Ce liquide se stérilise par filtration ; son pH est de 7-7,4.

Solution de Tyrode

Les sels cristallisés, chimiquement purs, doivent être dissous dans l'ordre suivant :

NaCl	8	gr
KCl	0,20	gr
CaCl ₂	0,20	gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10	gr
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,05	gr
NaHCO ₃	1,00	gr
Glucose	1,00	gr
H ₂ O	1.000	cc

Après sa préparation le Tyrode est stérilisé par filtration ; son pH varie de 7,4 à 7,8. Comme il a tendance à s'alcaliniser le pH sera ajusté par du CO₂.

Point de congélation — 0,62° C.

Solution de Simms

C'est une variante de la solution de Tyrode qui sert de base aux milieux synthétiques et que l'on associe au sérum ultra-filtré.

NaCl	8	gr
KCl	0,20	gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,147	gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,203	gr
Na ₂ HPO ₄	0,213	gr
NaHCO ₃	1,01	gr
H ₂ O	1.000	cc

Cette solution ne peut être autoclavée car elle contient du bicarbonate de soude. Elle est stérilisée par filtration. Le pH de cette solution est ajusté avec du CO₂.

Solution de Earle

NaCl	6,80	gr
KCl	0,40	gr
CaCl ₂	0,20	gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20	gr
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,14	gr
NaHCO ₃	2,20	gr
Glucose	1,00	gr
H ₂ O	1.000	cc

La solution est stérilisée par filtration.

Solution de Gey

NaCl	8	gr
KCl	0,38	gr
CaCl ₂	0,13	gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,21	gr
NaHCO ₃	0,25	gr
KH ₂ PO ₄	0,025	gr
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,30	gr
Glucose	1,00	gr
H ₂ O	1.000	cc

2. — LES SOLUTIONS TAMPONS.

Les milieux de l'organisme sont fortement tamponnés. Lors de la culture des tissus *in vitro* il est indispensable de se rapprocher le plus possible des conditions existant dans l'organisme.

Pour limiter les variations de pH trop grandes (qui seraient incompatibles avec la vie du tissu) on introduit dans les milieux de culture des substances tampons (ayant plusieurs constantes de dissociation). Les sels de l'acide phosphorique conviennent dans ce cas.

On prépare les deux solutions M/15 suivantes :

	Na ₂ HPO ₄	9,47 gr
	Eau distillée q.s.p.	1.000 cc.
et		
	KH ₂ PO ₄	9,08 gr
	Eau distillée q.s.p.	1.000 cc

En faisant varier la concentration de ces solutions on peut tamponner les milieux de culture à des pH variant de 5 à 8,2 [83].

3. — LES MILIEUX ORGANIQUES.

a) *Sérum ultrafiltré*

Les travaux de Simms et de Sanders [99] ont montré l'intérêt d'un tel milieu dans le développement *in vitro* des tissus.

La méthode d'obtention du sérum ultrafiltré est décrite au chapitre « Culture Frenkel ».

b) *Plasma*

Le plasma de coq est le plus fréquemment employé. Après 24 heures de jeûne le coq est fixé dans un appareil à contention, son cou est déplumé, badigeonné à la teinture d'iode, recouvert d'un champ opératoire stérile.

La carotide est découverte, pincée à l'aide d'une pince hémostatique et légèrement sectionnée afin de pouvoir introduire l'extrémité effilée d'une pipette de gros calibre.

Le sang obtenu est centrifugé pendant 5 minutes. Le plasma est placé dans des tubes paraffinés au réfrigérateur où il peut se conserver plusieurs semaines.

Chez les mammifères il est nécessaire de recueillir le sang en

présence d'une solution d'héparine à 1 0/00 (0,2 cc pour 100 cc de sang).

c) *Extrait embryonnaire*

L'extrait embryonnaire de poulet est considéré depuis Carrel comme la meilleure source de tréphones.

Des embryons de poulet de 9 jours sont prélevés stérilement broyés très finement. La pulpe obtenue est centrifugée pendant 15 minutes à 6.000 tours. Le surnageant est l'extrait embryonnaire concentré ; il est dilué au moment de l'emploi à 20 ou 30 % dans du liquide de Tyrode.

Il se conserve ainsi pendant une semaine à + 2°. Les jeunes embryons de mammifères ainsi que les extraits d'organes sont fabriqués de la même façon.

D. — CHOIX DU TISSU DE CULTURE

La présence d'un tissu vivant est une condition essentielle de la réussite de la culture des virus *in vitro*.

Les tropismes des différents virus, leurs affinités pour des tissus déterminés de l'organisme, ont servi de directives dans le choix des tissus.

S'il s'agit d'un virus épithéliotrope ou neurotrope, pour la culture de ceux-ci, il faut choisir les tissus correspondants ou appartenant au moins au même feuillet blastodermique.

Il a été démontré que pour divers virus les tissus d'embryons fournissent des milieux nutritifs meilleurs que ceux des animaux déjà nés. Mais tous les virus n'ont pas des exigences aussi exclusives en ce qui concerne le choix des tissus de culture et il n'est pas toujours indispensable d'utiliser des tissus adultes ou des tissus embryonnaires provenant d'un animal réceptif.

Le virus de la variole est le moins exigeant, il peut se multiplier dans l'épithélium cutané aussi bien que dans les tissus conjonctif, nerveux ou rénal.

Le virus de l'herpès et celui de la stomatite vésiculeuse sont également peu exigeants. Au contraire les virus de la peste porcine, du looping-ill et de la fièvre aphteuse se montrent plus exigeants.

Il résulte de la quasi unanimité des recherches faites jusqu'ici que le virus aphteux se multiplie exclusivement dans le tissu épithélial.

Les efforts infructueux de Hecke, Maitland, ainsi que Frenkel et Van Waveren, pour cultiver le virus aphteux sur des fibroblastes de poule sont bien connus. Les essais de culture faits en présence de cellules mésenchymateuses provenant de lapins, de porcs ou de veaux ont échoué (Frenkel).

Il résulte clairement de ces constatations que les fibroblastes ne constituent pas un support favorable à la culture du virus aphteux.

Pour cultiver *in vitro* un virus ayant un tropisme bien défini il est donc nécessaire de se servir du tissu spécifiquement atteint au cours de la maladie naturelle.

III. — Les méthodes de culture.

A. — CULTURE DES VIRUS SUR CELLULES EN VOIE DE PROLIFÉRATION

1. *Méthode de la goutte pendante.*

Cette méthode est la technique primitive de Carrel [21]. Au centre d'une lamelle couvre-objet on dépose une ou plusieurs gouttes de plasma puis on ajoute plusieurs gouttes d'un mélange à parties égales d'extrait embryonnaire et de solution de Tyrode.

Le mélange ainsi obtenu est brassé doucement à l'aide d'un stylet. Au centre de ce milieu est introduit un fragment tissulaire inoculé avec le virus que l'on désire cultiver. Sous l'action du jus embryonnaire le plasma coagule et la fibrine emprisonne le fragment tissulaire.

La lamelle est alors retournée et posée sur une lame à concavité spéciale, ses bords sont scellés à la paraffine. Les lames sont placées dans une boîte de Pétri et mises à l'étuve à 37° C.

La culture croît rapidement, elle double de surface en 48 heures. Les repiquages se font tous les deux ou trois jours lorsque le plasma commence à se liquéfier. A cette date le milieu nutritif est épuisé, les déchets produits par le métabolisme exercent une action nuisible sur les cellules et le virus.

La culture est ouverte. Avec un couteau on soulève la lamelle et on la retourne sur un champ stérile. Le fragment tissulaire est séparé du caillot plasmatique puis découpé en petits morceaux et broyé avec du sable fin stérile.

Le broyat est émulsionné dans une solution tampon puis filtré. Le virus ainsi obtenu peut servir à effectuer les passages suivants ; on peut le titrer au préalable par inoculation aux animaux sensibles.

Cette méthode permet des examens histologiques et l'entretien de souches pures de virus pendant très longtemps. Les passages sont faciles. Les inconvénients sont : le rendement infime en virus et la présence du plasma capable d'inhiber la multiplication du virus.

2. Méthode des flacons de Carrel.

Cette technique fut imaginée par Carrel en 1926, elle simplifie l'entretien du milieu. La culture se fait en deux phases, une inférieure plasmatique contenant les fragments d'organes, surmontée d'une phase liquide renouvelable à volonté [22].

On obtient par cette méthode des quantités plus grandes de virus ; l'étude du métabolisme et la différenciation cellulaire sont plus faciles. Les milieux sont identiques à ceux de la méthode précédente.

Dans un flacon de Carrel on introduit 0,6 cc de plasma, puis 0,6 cc d'extrait embryonnaire dilué en liquide de Tyrode. Après mélange par agitation du flacon on introduit les fragments de tissu. Le plasma coagule, on ajoute alors 1,2 cc d'extrait embryonnaire dilué ou d'un liquide nutritif de composition connue.

Pour les repiquages du virus, la culture est broyée stérilement en présence de sable, diluée dans le liquide de culture ou dans du liquide physiologique tamponné, et centrifugée. Le liquide surnageant sert à ensemercer de nouvelles cultures.

Cette méthode a fait faire des progrès considérables à l'étude des cellules de tissus et de virus.

3. Méthode des Roller-tubes.

Cette méthode fut décrite en 1933 par Gey [39]. Elle permet la culture en masse de divers tissus dans des tubes horizontaux à rotation axiale.

Les cultures s'effectuent dans des tubes en verre pyrex de 16×150 mm. dont la paroi interne est recouverte dans ses $2/3$ inférieurs, d'une fine couche composée de 40 % de plasma de poule mélangé avant coagulation à 40 % de sérum humain (provenant du sang du cordon ombilical prélevé à la naissance),

10 % d'extrait embryonnaire bovin et de 10 % de solution physiologique équilibrée.

Les fragments de tissu sont inclus dans ce coagulum, à raison d'une vingtaine par tube. Un liquide nutritif de même composition que le substrat à l'exception du plasma, est introduit en petite quantité (10 gouttes par tube) ; puis les tubes sont bouchés et mis en place presque horizontalement dans un appareil rotatif.

De la sorte, tubes et cultures tournent lentement sur leur axe (12 tours à l'heure) ; les tissus sont tantôt baignés par le milieu liquide, tantôt au contraire restent exposés à l'air.

Les repiquages sont ainsi supprimés ; on se contente de prélever périodiquement la phase liquide où le virus se trouve en abondance et de la remplacer par du liquide frais.

Cette méthode a permis aux auteurs d'obtenir une multiplication continue du virus pendant plusieurs mois et d'effectuer une étude très complète sur les cellules en survie.

4. *Méthode de la gélose tissu.*

Cette méthode a été créée par Zinsser et Coll. [114] pour la culture des rickettsies. On s'aperçut par la suite que la méthode donnait de bons résultats avec les virus.

La gélose inclinée est préparée en mélangeant :

Solution de gélose à 4 %	150 cc
Solution de Tyrode	150 cc
Sérum de cheval	150 cc
Solution de rouge de phénol	8 cc

Le mélange est réparti à raison de 8 cc par tube, laissé incliné pendant le refroidissement.

Le tissu est broyé en présence de la suspension virulente et les fragments sont déposés à la surface de la gélose. Les repiquages se font par prélèvement des fragments cultivés, broyage en présence de tissus frais et étalement sur de nouvelles géloses.

Yanamura et Meyer [112] remplacent la solution de Tyrode par celle de Simms et cultivent le virus psittacosique avec un rendement important.

Cette méthode a fait ses preuves. Sa simplicité et l'adsorption continue des déchets du catabolisme cellulaire par la gélose en font une bonne méthode d'avenir pour la culture des virus.

5. *Méthode des membranes plastiques.*

Cette technique a été primitivement conçue par Porter, Claude et Fullam [89] pour l'étude des virus au microscope électronique ; elle s'est révélée suffisante pour pouvoir être employée couramment dans la culture des virus sur tissu [77].

La technique en est la suivante :

5 cc de plasma sont mélangés à 5 cc d'extrait embryonnaire (ou de rate) dans un tube à centrifuger, avec des perles de verre, puis fortement agités pour réduire le caillot plasmatique en petits fragments. Une centrifugation prolongée (20 minutes à 6.000 tours) permet de décanter un milieu liquide, la fibrine restant au fond du tube.

A ce milieu (7 à 8 cc environ) sont ajoutés 5 cc d'extrait embryonnaire (préparé en broyant avec des billes de verre un embryon de poulet de 10 à 12 jours) et 9 à 10 cc de solution de Tyrode additionnée ou non de 100 ui/cc de pénicilline.

La membrane plastique est préparée en faisant tomber une goutte de solution de formvar sur du liquide de Ringer refroidi à $+4^{\circ}$ où elle est reprise par une lamelle. Les tissus à cultiver sont découpés en petits fragments, inoculés avec le virus et placés à l'intérieur d'un anneau de verre posé sur la membrane plastique.

Le milieu (0,2 cc) est introduit par capillarité entre la membrane et la lamelle qui lui sert de soutien. Il diffusera à travers la membrane et assurera la nutrition des fragments tissulaires. Le tout est placé dans une boîte à culture, fenêtrée et aménagée spécialement.

Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures.

Cette méthode a l'avantage de séparer le milieu nutritif des tissus en culture, ce qui permet de renouveler et de modifier le milieu à volonté.

B. — CULTURE DES VIRUS SUR CELLULES EN SURVIE.

Méthode de Maitland

Cette méthode a été décrite en 1928 par H.-B. et M.-C. Maitland [72].

Ces auteurs réussirent la culture du virus vaccinal en milieu liquide, en présence de cellules en état de prolifération résiduelle.

La méthode consiste essentiellement en la suspension dans un erlenmeyer de 50 cc, de 0,5 gr. de tissu haché dans un milieu liquide renfermant un mélange de sérum (6 cc) et de solution de Tyrode (12 cc).

Après inoculation, le tout est porté à l'étuve, et les passages se font à intervalles de deux ou trois jours, par transfert d'un peu de milieu liquide ou de broyat cellulaire de l'ancien flacon dans un nouveau milieu identique au premier.

La simplicité de cette technique et les bons résultats obtenus ont conduit une foule d'auteurs à s'en inspirer, et la plupart des virus ont pu ainsi être cultivés.

Toutes sortes de tissus peuvent être utilisés suivant les affinités du virus étudié.

La complexité de la composition du sérum a été une source d'incertitude vis-à-vis de son comportement à l'égard du virus. Aussi a-t-on recherché à s'en débarrasser. Dès 1930 Li et Rivers [68] l'ont éliminé. Ces auteurs cultivent avec succès le virus vaccinal sur des fragments d'embryon de poulet en suspension dans du liquide de Tyrode.

Malgré sa simplicité ce milieu a pu servir à la culture d'un grand nombre de virus. Néanmoins dans beaucoup de cas il apparaît insuffisant ou même toxique. Aussi Simms et Stillman [100] et Simms et Sanders [99] substituent au sérum total, le sérum intrafiltré associé à une solution physiologique tamponnée du type Tyrode, qui permet d'obtenir des cultures bien meilleures.

Simms et Coll. considèrent que l'ultrafiltration prive le sérum d'un facteur B responsable de la dégénérescence graisseuse des cellules, mais qu'elles conservent un facteur A stimulateur de la croissance.

En fait le sérum est un milieu fort complexe et il est difficile de déterminer le rôle exact de ses différents constituants. L'expérience prouve en tout cas que l'élimination des grosses molécules améliore la valeur du sérum qui perd d'ailleurs sa spécificité d'espèce et sa spécificité sérologique. Ce milieu est fortement tamponné et, de plus, le pH peut être rajusté avec du CO₂ lors de chaque ouverture des flacons.

La méthode de culture des virus sur tissu en survie apparaît actuellement comme une des meilleures techniques de culture des virus *in vitro*. Son indication majeure est la culture en masse des virus en vue de la fabrication des vaccins.

IV. — Facteurs influençant la culture des ultra-virus in vitro.

A) *Influence de la température.*

La température de 37° n'est pas nécessairement la plus favorable à la culture des virus. En 1930, Hecke obtient les mêmes titres pour le virus aphteux entre les températures de 30° et 37°. A 26° aucune prolifération n'a lieu. Sanders et Molloy (1949) obtiennent la meilleure prolifération du virus de l'encéphalomyélite des équidés à la température du laboratoire.

L'agent de la poliomyélite, souche murine, étudié par Sanders et Jungeblut, tolère également bien les écarts de température. Tompson et Coates en 1942 ont déterminé que les virus herpétique, myxomateux et vaccinal cultivaient le mieux à des températures situées entre 35° et 38°. Certains virus prolifèrent mieux à la température du laboratoire, ainsi le virus de la kérato-conjonctivite épidémique et de l'encéphalite des équidés. Mais d'une façon générale, on peut admettre que la température la plus favorable au virus sera de quelques degrés inférieure à celle qui permet la meilleure culture cellulaire.

B) *Influence du pH.*

L'influence du pH dans les cultures des ultravirus in vitro, quelle que soit la méthode, est très grande.

Au cours de tout travail avec les virus, il faut prendre en grande considération leur sensibilité vis-à-vis du pH. Il faut également tenir compte de ce fait lors de la culture des virus in vitro, où il ne faut pas non plus oublier l'optimum de pH du tissu.

Plus la quantité de tissu en culture est grande, plus le pH s'abaisse. Les cultures tissulaires elles-mêmes semblent avoir une tolérance considérablement plus grande surtout dans la zone acide. Il semble établi que l'activité d'un virus en culture n'influence pas directement sur le pH, ou du moins si peu que cette action est masquée par la respiration tissulaire. Il est évident par contre que le virus agira sur le pH par l'intermédiaire de son action sur les cellules. Quoiqu'il en soit la presque totalité des auteurs considèrent que le pH le plus favorable pour les ultravirus en culture varie entre 7,2 et 7,6.

C) *Influence du milieu nutritif.*

Le plasma n'est pas indispensable à une bonne culture des ultravirus, dans certains cas il peut même être nuisible, car, provenant d'animaux adultes, il peut conférer aux cultures la résistance de ceux-ci au virus en question. D'une façon générale le sérum ultrafiltré est nécessaire pour les cultures de longue durée ; des expériences comparatives, précises pour beaucoup de virus ont montré que l'on obtient une prolifération meilleure dans ce milieu.

La constitution de la solution physiologique a son importance ; ainsi le Tyrode ou le liquide de Simms et leurs variantes ne peuvent pas être remplacés par de simples solutions tampons au phosphate.

Le bicarbonate, en particulier, semble nécessaire et le glucose, bien qu'il ne soit pas toujours indispensable, paraît jouer un rôle important.

D) *Influence du rapport quantitatif entre le tissu et le milieu liquide.*

Ce rapport, outre son influence sur la culture ou la survie cellulaire elle-même semble avoir une action importante sur la prolifération du virus. Plotz estime qu'une trop forte proportion de liquide inhibe l'aération indispensable à toute prolifération, le contraire est d'ailleurs également vrai.

Quoique Frenkel ait réussi à cultiver le virus aphteux dans un milieu composé en parties égales de tissu et de milieu liquide, la très grande majorité des auteurs s'accordent pour choisir approximativement une proportion de tissu de 1/50 à 1/20. Toutefois il semble que dans certains cas, une forte proportion de tissu puisse être compatible avec une bonne culture, à condition que les repiquages se fassent à intervalles très rapprochés.

E) *Influence de la pression osmotique.*

Au cours de la culture d'un tissu in vitro, il est nécessaire de se rapprocher le plus possible des conditions de vie naturelles. Dans ce but, et afin que les échanges cellulaires puissent s'effectuer, les milieux nutritifs devront être isotoniques et avoir une pression osmotique comparable à celle des milieux naturels.

La pression osmotique peut être entre autres calculée par la détermination du point de congélation qui peut varier selon les milieux et les espèces de $-0,48^{\circ}$ à $-0,65^{\circ}$ C (Pour le sérum de poule il est de $-0,60^{\circ}$ à -65° C ; pour le sérum de lapin de $-0,55^{\circ}$ à $-0,66^{\circ}$ C ; pour le sérum humain de $-0,48^{\circ}$ à $-0,65^{\circ}$ C). Les milieux nutritifs lors de la culture des tissus in vitro devront avoir des points de congélation analogues. Le point de congélation du liquide de Tyrode est de $-0,62^{\circ}$ C, celui du milieu Frenkel est de $-0,56^{\circ}$ C.

F) *Influence de l'oxygénation.*

L'oxygénation des tissus en culture semble très importante lorsqu'on opère sur des quantités considérables de tissus (Culture Frenkel). La respiration cellulaire est très sensible à une élévation même modeste de la température. Elle cesse complètement au-dessus de 42° C.

Pour l'aération des cultures on peut utiliser soit le carbo-gène (5 % CO₂ et 95 % O₂) soit le mélange : CO₂ 8 %, O₂ 21 %, N₂ 71 %.

V. — Application de la méthode de la culture des virus in vitro à la fabrication des vaccins.

La culture in vitro permet d'obtenir de grandes quantités de virus bactériologiquement stérile et dépourvu de protéines étrangères. Il semble donc qu'on soit dans les meilleures conditions pour préparer des souches qui puissent servir de vaccin. De nombreuses tentatives ont été faites dans ce sens. Cependant malgré le succès de certaines d'entre elles (virus aphteux) l'ensemble des résultats n'a pas été aussi bon qu'on aurait pu l'espérer. En effet très souvent les virus cultivés in vitro perdent non seulement leurs affinités et leur virulence pour une espèce considérée, mais également leur pouvoir antigène et ne peuvent par ce fait être utilisés pour la vaccination.

On a essayé de vacciner avec les virus : vaccinal, grippal, poliomyélitique, psittacosique, rabique, de l'encéphalomyélite équine et de la peste aviaire.

Le virus vaccinal de culture a été assez largement utilisé comme vaccin et a donné des résultats favorables sans compli-

cations. Mais il a dû être bientôt abandonné du fait de l'irrégularité de son pouvoir antigène après un certain nombre de passages.

Quand aux essais de vaccination avec les autres virus, ils demeurent encore purement théoriques. S'il est expérimentalement possible de vacciner les animaux et les hommes avec ces virus, aucune des méthodes n'est jusqu'ici susceptible d'application pratique.

Trop délicates, trop onéreuses, elles n'aboutissent qu'à la préparation de quantités très faibles de vaccin. C'est pourquoi on leur a préféré les méthodes de culture *in vivo* ou *in ovo*.

VI. — Avantages de la culture des ultra-virus *in vitro*.

La culture des ultravirus *in vitro* a réalisé de grands progrès et elle a puissamment contribué à stimuler toute la microbiologie.

Tous les virus ont pu être cultivés *in vitro*. La prolifération pratiquement indéfinie de nombreux d'entre eux a été obtenue. La méthode s'est révélée d'une grande fécondité dans l'étude théorique des virus d'une part, d'autre part certains d'entre eux, ainsi le virus aphteux de culture, ont pu être utilisés avec succès dans la lutte contre la maladie naturelle.

Comme nous venons de le voir la culture des autres virus n'a pas donné dans ce domaine les résultats escomptés.

La culture des tissus présente de si belles possibilités de fixation et de coloration que les auteurs ont très rapidement cherché à utiliser celle-ci pour la vérification des lésions cellulaires produites par les différents virus *in vivo*. Grâce à cette méthode on a pu mettre en évidence la situation intra-cellulaire et la formation des colonies de corpuscules élémentaires. Sur des cellules en longue survie des observations très précises ont été faites sur le cycle intracellulaire de certains virus (virus vaccinal, psittacique, de la lymphogranulomatose).

Il est apparu que la culture de tissu pouvait être dans certains cas un moyen plus sensible que l'inoculation à l'animal pour déceler des faibles doses de virus. Il en est ainsi dans le cas de l'encéphalomyélite des équidés (souche est), de l'encéphalite japonaise, de la lymphogranulomatose, de l'encéphalite de St Louis, de la kérato-conjonctivite épidémique.

La possibilité d'utiliser la culture de tissus pour titrer in vitro des suspensions de virus est une conséquence de la sensibilité de cette méthode. La première réalisation a été faite en 1941 par Yanamura et Meyer. Ces auteurs constataient dans leurs expériences sur la psittacose, que la dilution du virus qui infecte la culture au départ détermine étroitement l'allure de sa courbe de croissance. Des expériences comparatives avec le titrage par inoculation à la souris montre un parallélisme frappant. Huang (1942) met au point une méthode de titrage dont le principe est basé sur l'inhibition de la prolifération tissulaire par un virus. Le tissu en question doit être très sensible et très favorable au développement du virus. D'autre part pour que ces méthodes de titrage puissent s'appliquer, il est évidemment essentiel que l'agent pathogène agisse défavorablement sur la prolifération cellulaire. Or exceptés les virus dont l'action a été histologiquement démontrée (vaccine, ectromélie et groupe psittacose lymphogranulomatose) de trop rares études précises ont été entreprises sur l'action spécifique des virus sur les cellules pour que la méthode de Huang puisse trouver immédiatement application.

A la suite des travaux de Enders il est actuellement possible de procéder à l'identification des types du virus poliomyélitique grâce à la culture des tissus. Le principe de la méthode consiste à cultiver in vitro un tissu convenable pouvant servir de support au virus (tissu embryonnaire, testiculaire, tonsillaire).

Dès que le tissu en culture montre une croissance fibroblastique abondante, l'introduction du virus poliomyélitique dans la culture entraîne en 48 à 72 heures la dégénérescence nécrotique des fibroblastes qui se manifeste d'une façon caractéristique, aisément reconnaissable aux faibles grossissements du microscope. Au contraire si le virus introduit est neutralisé par un sérum spécifique, la dégénérescence ne se produit pas et la culture inoculée conserve le même aspect et le même potentiel de croissance que la culture témoin.

Il est donc possible, au moyen de cette méthode élégante et facile, soit de déterminer la présence et la nature des anticorps dans le sérum d'un sujet sain ou malade en faisant agir le sérum à essayer sur les trois souches types du virus poliomyélitique entretenues en culture, soit de démontrer la présence du virus dans un produit pathologique quelconque.

Comme on peut le constater, la culture des tissus est devenue un instrument remarquable de travail servant à la résolution de nombreux problèmes en ce qui concerne les maladies à ultravirus affectant l'homme et les animaux.

Enfin la culture des ultravirus n'offre pas seulement un intérêt théorique, mais comme le démontrent les travaux réalisés sur la fièvre aphteuse, elle a rendu de précieux services dans la prophylaxie de cette contagion.

QUATRIEME PARTIE

MODES DE CULTURE DU VIRUS APHTEUX

I. — Culture du virus aphteux in vivo.

A. — CULTURE SUR BOVINS

La culture in vivo du virus aphteux a été tentée chez presque tous les mammifères.

Il est certain que la production du virus sur les petits animaux de laboratoire est séduisante, mais deux difficultés se présentent : le virus aphteux ne cultive pas en grande quantité, il s'adapte et perd souvent ses qualités immunisantes pour le bovin.

1. *Culture du virus aphteux sur épithélium lingual de bovins.*

Cette méthode est encore très utilisée de nos jours pour la production du virus. Elle est néanmoins très onéreuse bien que le matériel récolté soit très riche en virus. Un bovin produit environ 60 grammes de matériel virulent [110].

Les bovins producteurs de virus doivent être importés des régions indemnes de fièvre aphteuse afin qu'ils réagissent bien à l'infection. Après fixation dans un travail, ils sont inoculés en intradermique dans la muqueuse linguale en plus de 200 points différents (la quantité de liquide virulent à injecter étant de 30 à 40 cc).

Le temps optimum pour la récolte des aphtes est de 24 à 26 heures après l'inoculation ; avant, les aphtes ne sont pas suffisamment développés ; après, ils sont déchirés et leur virulence diminue rapidement. Les bovins sont alors abattus, les langues prélevées, suspendues, lavées sommairement à l'eau et les aphtes avec la lymphé recueillis par grattage avec un grand couteau. Les produits virulents sont pesés et conservés dans des boîtes de carton paraffiné à — 40° C.

La production du virus par cette méthode nécessite beaucoup de précaution et de travail, pour la pratiquer de magnifiques instituts ont été construits dans toutes les parties du monde.

2. Culture du virus aphteux en symbiose avec le virus vaccinal.

Belin inocule par la méthode de vaccination en nappe de Chaumier, sur la peau d'une génisse, d'une part le virus vaccinal, d'autre part et en dehors du champ précédent le virus aphteux par scarification. La pulpe vaccinale obtenue est riche en virus aphteux et constitue le « complexe vaccino-aphteux » [12].

La génisse est entièrement tondue, lavée, rasée puis de nouveau savonnée, brossée, séchée avec des linges stériles et scarifiée. La pulpe vaccinale est étendue sur ces scarifications, sauf au niveau de l'épaule et de la région dorsale droite qui est recouverte de complexes vaccino-aphteux. Simultanément pour plus de sécurité on inocule le virus aphteux au niveau de l'encolure. L'animal est revêtu de deux toiles stériles qui sont changées tous les jours. Le 4^e ou le 5^e jour l'animal est sacrifié par saignée totale et le complexe récolté par raclage. Le poids du « complexe » obtenu varie entre 600 et 900 grammes par animal. Le titre du virus récolté par cette méthode atteindrait 10^{-6} .

3. Autres procédés de culture du virus aphteux.

Ducloux, Rinjard et Mlle Cordier [25] obtiennent le développement du virus aphteux dans la grande pustule sous-cutanée produite chez le mouton par l'inoculation du virus claveleux.

Mlle Cordier [23] confirme ces données en 1940 et signale que, non seulement le développement du virus aphteux dans l'œdème claveleux assure une abondante récolte du virus aphteux, mais encore que la symbiose ainsi réalisée, adsorbée sur le charbon animal, permet de vacciner à la fois contre la fièvre aphteuse et contre la clavelée.

Rinjard et Mlle Cordier montrent même qu'un œdème aseptique sous-cutané, provoqué par une substance irritante comme l'huile de croton, peut devenir le siège d'une pullulation accentuée du virus aphteux.

Frenkel provoque artificiellement des phlyctènes chez le porc au moyen d'onguent de cantharides et injecte la région avant, pendant ou après l'application du vésicant. La teneur en virus

des vésicules est toujours moindre que celle de l'aphte normal.

Dans la pratique ces méthodes d'obtention de virus n'ont pas été retenues car la teneur en virus était trop faible.

B. — CULTURE DU VIRUS APHTEUX CHEZ LES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE

1. *Culture sur cobaye*

L'adaptation des virus bovins au cobaye ne se fait pas sans difficulté, l'infection lors des premiers passages n'est pas toujours obtenue. Quelquefois, au cours de ceux-ci, le virus perd ses qualités pathogènes, même pour le cobaye.

C'est Hecker (1899) qui a démontré la réceptivité du cobaye au virus aphteux. L'inoculation par voie intradermique dans le coussinet plantaire d' $1/4$ cc de lymphé ou filtrat de broyage d'aphtes dilué souvent jusqu'au $1/100.000$, déclanche, 18 à 24 heures après, l'apparition de petites vésicules se réunissant en un aphte dit primaire dans la région inoculée ; vers la 30^e heure le sang est virulent et, en 48 heures le coussinet plantaire opposé présente un aphte dit secondaire ; puis l'infection se généralise ; le 3^e jour des aphtes apparaissent sur la langue, la muqueuse buccale, les lèvres et le bord des gencives.

Le cobaye offre l'intérêt primordial de ne pas s'infecter par contact, d'autre part l'évolution de la fièvre aphteuse est régulière chez lui. Au moment où le sang est virulent l'organisme l'est en sa totalité.

Les cobayes sont sacrifiés entre la 24^e et 30^e heure après leur inoculation. La peau, les viscères abdominaux, les os sont éliminés. Le reste du cadavre trituré soigneusement à l'appareil Latapie.

La quantité moyenne de pulpe obtenue est d'environ 80 gr. pour un cobaye de 400 gr. Le broyat dilué en eau physiologique (q.s.p. 500 cc) est riche en virus. Un cobaye de 500 gr. peut fournir suffisamment de virus pour préparer un vaccin formolé de quoi immuniser 20 bœufs.

Quoiqu'il en soit le cobaye reste un bien discret producteur de virus aphteux, ses aphtes plantaires sont insuffisants et les masses musculaires paraissent pauvres en virus. D'autre part le virus adapté au cobaye perd ses qualités pathogènes et immunisantes à l'égard des bovidés [92].

2. Culture sur lapin

Dès 1890-91 Becker a montré la réceptivité du lapin à la fièvre aphteuse, fait qui fut confirmé par Hecker en 1899.

Cultivé dans la chambre antérieure de l'œil, le virus aphteux perdrait sa virulence tout en gardant ses propriétés immunisantes.

Giroud et Jezierski (1947) cultivent le virus aphteux dans le poumon du lapin et démontrent que le pouvoir antigénique du virus est conservé pour le mouton et le cobaye. La récolte est assez abondante ; elle est de l'ordre de 60 à 120 gr. (Poumon + sérosité).

3. Culture sur souris

Les premières tentatives faites pour produire des signes cliniques d'infection aphteuse chez la souris blanche furent sans succès.

Plus tard, se basant sur les travaux faits avec les virus de la fièvre jaune, de la peste équine et de l'encéphalomyélite équine, qui par passages sur cerveaux de souris donnent d'excellents vaccins, une tentative semblable a été faite par Nagel (1937) avec le virus aphteux. Cet auteur a constaté qu'il était possible de maintenir le virus chez la souris blanche, mais qu'il fallait prélever le cerveau 24 à 48 heures après l'inoculation. Les signes cliniques chez la souris apparurent après 140 passages intracérébraux.

Hoffmann (1941, 1944), Galloway (1933), Röhrer (1944) et Hudson (1947) ont fait des expériences avec 7 différentes souches du virus aphteux. Cinq ne donnèrent point de signes cliniques après 36 à 104 passages. Les deux autres donnèrent des signes après respectivement 76 et 144 passages intracérébraux. Il faut encore beaucoup de passages avant que le virus perde son pouvoir pathogène pour les bovins. Ces souches-là n'ont jamais été utilisées dans la pratique.

Röhrer (1952) essaye d'obtenir sur cerveau de souris un virus neurotrope se comportant comme vaccin chez les bovins. Il adapte au cerveau de souris un virus cobaye. Un vaccin adsorbé fabriqué avec un virus cérébral du 50^e passage selon la méthode classique protège le bovin d'une façon satisfaisante contre le virus homologue et le virus cérébral. Ces expériences n'ont pas donné de suite car le virus disparaît entre le 150^e et le 180^e passage intracérébral.

Les souris utilisées par ces auteurs avaient de 4 à 5 semaines. Si des souris non sevrées avaient été utilisées une maladie fatale aurait été remarquée dès les premiers passages avec des lésions importantes au niveau des muscles squelettiques.

Skinner [103] en travaillant avec des souris de 14 à 16 jours découvrit que le virus aphteux inoculé en intra-péritonéale ou intracérébrale déterminait la mort des souriceaux en un temps assez court. Plus tard il s'aperçut que les souriceaux de 7 à 10 jours étaient plus sensibles encore, par contre la sensibilité n'augmente pas avec des souriceaux de moins d'une semaine.

Skinner expérimenta avec 9 souches bovines et 6 souches cobayes du virus aphteux. Avec des souris de 7 à 10 jours le symptôme le plus évident est la paralysie spastique des muscles du train postérieur, puis la mort survient très vite. Les troubles respiratoires sont souvent présents dès le début. Après un ou deux passages les symptômes apparaissent entre 20 et 48 heures après l'inoculation, même avec des doses infectantes minimas et les souriceaux survivent rarement plus de 12 heures après l'apparition des premiers symptômes. Si l'évolution de la maladie est brève et les souris jeunes, aucune lésion macroscopique n'est constatée sur les muscles squelettiques. Par contre chez les souris âgées, donc plus résistantes, chez qui l'évolution de la maladie est beaucoup plus longue et la mort ne survient qu'après quelques jours ; des lésions sont observées à partir du 4^e jour après les premiers symptômes. Les muscles du train postérieur ont quelquefois jusqu'à 90 % de leurs fibres en état de dégénérescence et apparaissent de couleur jaune pâle.

Les muscles de l'avant-main peuvent également être affectés. Le membre postérieur du côté de l'inoculation est souvent atteint avant son homologue.

Le titrage des membres montre que celui qui est paralysé peut avoir un titre au moins 100 fois plus élevé que son homologue non encore atteint. Des lésions similaires sont constatées sur le cœur, chez 40 à 50 % des souris âgées d'une à deux semaines.

Lors de ses expériences Skinner fit trois observations qu'il confirma à plusieurs reprises :

a) Les titrages intradermiques faits sur le cobaye indiquent qu'au point crucial de l'infection, le sang, la rate, le cœur et les poumons contenaient chacun 100 fois plus de virus que le cerveau inoculé sur la même souris.

b) Les souriceaux sont également sensibles à l'inoculation intrapéritonéale qu'à l'inoculation intracérébrale.

c) Quelle que soit la voie utilisée les souris âgées de 2 à 2 1/2 semaines sont plus sensibles que les souris âgées de 3 à 4 semaines. Avec chaque voie le syndrome clinique est le même.

Donc le cœur fut choisi comme tissu de passages (certaines souches n'affectant pas le cœur, on utilise les membres postérieurs), la cavité péritonéale comme lieu d'inoculation et les souris non sevrées comme animaux d'expériences.

Les souches pendant les passages sur le souriceau gardent leur pouvoir antigène.

La souris non sevrée s'est montrée être un animal de choix, très sensible, pour détecter le virus aphteux à des dilutions très fortes.

C'est pourquoi elle est aujourd'hui couramment utilisée pour titrer le virus aphteux. Les résultats obtenus sont supérieurs à l'inoculation intradermique du cobaye.

Il est également possible de faire directement sur des souris des tests de neutralisation du sérum avec des souches bovines du virus aphteux et du sérum bovin. Dans un tel test le sérum bovin de convalescent, montre à une dilution de 1/80 un indice de neutralisation de 10.000. Ce chiffre est plus élevé que celui obtenu chez la vache pour un sérum non dilué, or on sait que le bovin est le seul autre animal pratique pour cet usage (Brooksby 1949).

D'autre part il se peut que la souris non sevrée pourra servir pour la production du virus nécessaire à l'élaboration du vaccin.

Garcia, Mata, Pissi et Aramburu [38] au cours de leurs travaux sur l'adaptation du virus aphteux au souriceau, obtiennent des résultats tout à fait analogues à ceux de Skinner.

En outre ils mettent en évidence la grande sensibilité au virus aphteux du rat blanc âgé de 10 à 20 heures et pesant 4 à 6 grammes. Ils choisissent comme voie d'inoculation la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. Lors des premiers passages, la mort du rat blanc survient aux alentours de la 100^e heure après l'inoculation, tandis qu'après 78 passages, les rats ne survivent que 10 à 12 heures.

L'emploi du rat et de la souris peut donc servir à toutes les recherches relatives à la fièvre aphteuse et est supérieur à celui des autres animaux utilisés jusqu'à présent.

C. — CULTURE SUR TUMEUR GREFFÉE

Les ultravirus ont une électivité marquée pour les cellules en voie de prolifération et en particulier pour les tumeurs, siège d'une caryocynèse anarchique. Partant de ce principe, Bardach [10] greffe le liposarcome de Murray au cobaye. Le poids de la tumeur peut atteindre une centaine de grammes. Le virus aphteux inoculé dans un des coussinets plantaires est retrouvé régulièrement et à un taux élevé dans la tumeur située loin du point d'inoculation. La virulence du tissu tumoral est au moins égale et souvent supérieure à celle des lambeaux d'aphtes recueillis sur le même cobaye.

La tumeur prélevée après le sacrifice du cobaye représente une source abondante d'un virus qui a des propriétés antigéniques marquées. Ce virus a permis à Rinjard, Bardach et Bridé de préparer par hyperimmunisation de bovins, un sérum anti-aphteux de haute valeur [90].

D. — CULTURE SUR EMBRYOME GÉANT

Tout récemment J.-A. Thomas, J.-P. Thierry et L.-L. Salomon [107] s'inspirant des travaux de Bardach, ont créé une méthode très élégante de culture du virus aphteux in vivo sur embryome électif géant.

Le principe de la méthode consiste à provoquer chez un bovin réceptif le développement d'un embryome, où le virus que l'on veut cultiver se multipliera électivement. Ces tissus électifs sont prélevés aseptiquement sur le fœtus ou éventuellement, sur l'adulte de la même espèce. Ils sont convenablement pulpés et dilués, puis la suspension tissulaire ainsi préparée est implantée chez l'animal sensible en un endroit approprié ; sous la peau, dans la cavité abdominale, etc.

Les animaux en bonne santé supportent parfaitement l'injection de plusieurs litres de cette suspension. Celle-ci s'organise rapidement en un très volumineux embryome, tandis que l'organisme réagit par la production d'une ascite ou d'un œdème sous-cutané énorme.

L'analyse histologique montre qu'il s'agit d'une sorte de culture de tissus surtout épithéliale, immense. Après un délai d'environ 3 jours, nécessaire à l'organisation de l'embryome, l'animal reçoit l'inoculation du virus aphteux dans la muqueuse linguale.

La généralisation aphteuse s'étend avec la même vitesse et la même intensité que chez les animaux non préparés.

C'est alors que l'on prélève la sérosité et l'embryome que l'on broie. La quantité de matière brute récoltée peut atteindre et dépasser 15 kg. par vache, le titre de ce virus atteignant 10^{-8} .

Ces auteurs ont pu également cultiver par la même méthode le virus de la peste porcine. Un porcelet de 35 à 40 kg. peut donner 2.500 à 3.000 grammes de virus hautement virulent.

CONCLUSIONS

La culture in vivo du virus aphteux est surtout intéressante chez les bovins. C'est chez cette espèce que le virus trouve les éléments de sa multiplication et de sa virulence optimum. L'espèce bovine assure la persistance des souches dans leur spécificité, base de toutes les recherches. A défaut d'autres cultures, l'inoculation de la langue des bovins est la méthode couramment employée pour la production du virus, en vue de la fabrication industrielle du vaccin. La méthode Belin est également exploitée.

Les autres procédés n'ont pas d'application pratique, soit que le rendement ou le titre sont insuffisants ou irréguliers, soit que le pouvoir immunisant est sensiblement diminué pour les bovins. Une exception est toutefois à signaler en ce qui concerne l'utilisation du souriceau à l'allaitement. Nous avons vu en effet que sa grande sensibilité à l'inoculation du virus aphteux permet le titrage de celui-ci. En outre on peut envisager qu'un jour le virus souriceau pourra servir à la fabrication du vaccin.

Il serait souhaitable que la culture in vivo sur la langue des bovins d'un prix de revient considérable soit définitivement remplacée par les méthodes de culture in vitro ou in ovo respectant les qualités immunigènes du virus.

II. — La culture du virus aphteux in ovo.

Les résultats des essais de culture du virus aphteux in ovo sont très contradictoires. La plupart des expérimentateurs ont échoué et les rares travaux positifs n'ont pas été confirmés.

Frenkel et Van Waveren (1933) au cours de leurs travaux n'arrivent pas à cultiver le virus aphteux in ovo. Galloway (1937) réussit quelques passages en série sur œufs de cane embryonnés de 14 jours.

Peragallo (1937) fait 20 passages en série sur la chorio-allantoïde. Il observe des lésions vésiculaires au niveau du point d'inoculation.

En 1948, Traub et Schneider [108] affirment la possibilité de la culture in ovo du virus aphteux grâce à une série de passages alternés œuf-cobaye préliminaires.

Des embryons de 9 à 10 jours sont inoculés tantôt sur la membrane chorio-allantoïde, tantôt dans le sac vitellin. Les prélèvements s'effectuent 48 à 72 heures après l'inoculation. Le matériel virulent est constitué par un mélange des trois souches du virus aphteux (A, O, C). Après l'inoculation les embryons sont incubés à 37°6 C.

En opérant dans ces conditions ces auteurs obtinrent d'abord l'adaptation définitive à l'œuf de la souche O. (Les deux autres souches plus résistantes à l'adaptation continuent à être entretenues par des passages alternés).

Des bœufs inoculés sur la langue avec le virus du 145° et du 146° passage sur œuf ne présentèrent aucun signe de maladie. (Le virus avait donc perdu tout pouvoir pathogène pour le bœuf). Ces bœufs infectés par la suite avec du virus O virulent se montrèrent immuns, tandis que les témoins firent une fièvre aphteuse généralisée dans les 48 heures.

Le virus O ainsi adapté n'était également pas infectieux pour la chèvre, mais l'était encore pour le porc. (Il perd sa virulence pour celui-ci après le 198° passage).

Le virus A qui après un grand nombre de passages alternés a pu également être adapté à l'œuf embryonné, s'est révélé avirulent pour le bœuf dès le 72° passage et dès le 70° pour le porcelet.

Des vaccins adsorbés sur Hydroxyde d'aluminium ont pu être préparés et contrôlés sur bœuf.

Petermann [87] renouvelle les expériences de Traub : il cultive avec succès une souche par 6 passages alternés cobaye-œuf puis ensuite 25 passages d'œuf à œuf. Il pense que si au cours des premiers passages, le type du virus reste stable, il peut varier par la suite et conclut que le virus cultivé sur œuf ne répond pas encore aux exigences d'utilisation pratique.

Michelsen [78] a essayé, sans succès, la culture du virus aphteux par passages alternés bœuf-œuf, cobaye-œuf, culture de tissu-œuf, le virus disparaissait dans tous les cas.

III. — La culture du virus aphteux sur tissus greffés sur la chorio-allantoïde de l'œuf en incubation.

Faulkner et Galloway (1937) furent les premiers à cultiver le virus aphteux sur tissus embryonnaires de cobayes greffés sur la chorio-allantoïde. Leurs expériences ne furent pas concluantes car le virus survivait irrégulièrement.

Michelsen, Schjerner, Thiesen, Malmquist [78] en employant la méthode de Tenbrœck maintiennent le virus O pendant 14 passages en série et 2 passages alternés, ainsi qu'une souche du type A pendant 19 passages en série.

Malmquist a réussi à faire des passages alternés œuf avec tissu œuf sans tissu, mais il n'a pas été possible de faire des passages continus sans tissu.

Des essais poursuivis avec des œufs dont l'embryon a été extirpé au préalable, ont été faits selon la technique employée par Bernkopf pour cultiver le virus de l'influenza. Dans cette méthode on emploie des œufs incubés pendant 14 jours et qui sont vidés de tout leur contenu, à l'exception de la membrane chorio-allantoïde; celle-ci est laissée en place et c'est elle qui sert de support à la culture. Le tissu est préparé de la façon suivante : A 100 cc de liquide de Baker on ajoute environ 10 gr. d'épithélium lingual au préalable finement broyé en présence de 15 cc de liquide de Tyrode et 25 cc d'une suspension virulente (quantité pour 6 à 7 œufs). L'ensemencement effectué, les œufs désembryonnés sont placés sur un plateau animé d'un mouvement rotatoire de 10 tours par minute. L'incubation est de 24 à 36 heures.

Après 51 passages fait par cette méthode le virus O garde son pouvoir pathogène pour le cobaye.

IV. — Culture du virus aphteux *in vitro*.

A. — HISTORIQUE

Hecke [50] fut le premier à cultiver le virus aphteux *in vitro* sur peau embryonnaire de cobaye, selon la méthode de la goutte pendante. Presque en même temps et indépendamment M.-C. Maitland et H.-P. Maitland [72] cultivaient le virus aphteux dans les flacons de Carrel suivant une méthode qu'ils avaient employée pour la culture du virus vaccinal.

Hecke au cours de ses expériences observa que le tissu le mieux approprié pour la culture du virus aphteux était la peau des embryons de cobayes pesant environ 12 à 18 grammes, chez lesquels les poils commencent à pousser.

Les Maitland utilisent avec succès, lors de leurs cultures en masse un mélange de peau plantaire, de lèvres et de langues d'embryons de cobayes qu'ils coupent en petits morceaux : A 0,66 cc de tissu découpé ils ajoutent 1,33 cc. de virus. Après un séjour de ce mélange pendant une heure et demie à $+ 5^{\circ}$ C, ils ajoutent 12 cc de solution de Tyrode et 6 cc de plasma de cobaye hépariné. Ce mélange est introduit dans des flacons de Carrel à raison de 2 cc par flacon et placé à l'étuve à $37^{\circ}5$ C.

Les Maitland n'ajoutent pas à leur milieu d'extrait embryonnaire, car ils constatent que celui-ci ne favorise pas la multiplication du virus. Le titre maximum du virus est atteint après environ un jour et demi de culture.

Striegler [102] réussit à préparer selon la méthode de Maitland de 1.500 à 2.000 cc de liquide de culture virulent par semaine. Il cultive le virus sur de la peau de fœtus en solution de Drew.

Lors de ses premiers essais Frenkel cultive le virus aphteux sur peau embryonnaire de bovins, ovins et porcins dans du liquide de Tyrode additionné de plasma de veau, qu'il remplace bientôt par le plasma de poule ; celui-ci en donnant une coagulation plus solide procure une meilleure culture. Ultérieurement le plasma de poule, élément nutritif peu important, est remplacé par une solution de Ringer-gélose à 1,5 % qui sert de support à la culture.

Au cours des expériences ultérieures Frenkel réalisa la culture

du virus aphteux dans un milieu tout à fait liquide. Les constituants étaient dans les proportions suivantes : Filtrat de virus 1 ; tissu 1 ; sérum de bovin 5 ; solution de Tyrode 5. En omettant le sérum bovin la culture réussit quand même. Les infections bactériennes accidentelles se manifestant volontiers dans le milieu liquide Frenkel introduit du plasma de veau dans la culture, celui-ci ayant un pouvoir bactéricide.

Le type du virus reste inaltéré par ces procédés de culture, même après plus de 80 passages, mais l'activité de celui-ci est généralement beaucoup moindre que celle de la lymphe des aphtes spontanés.

Frenkel montre également qu'il n'est pas absolument nécessaire de découper la peau des embryons en petits fragments. Les titres obtenus sont moins élevés mais le danger de contamination est moindre [31].

La quantité de virus obtenue par ce procédé est faible, irrégulière et ne permettait pas d'envisager son emploi dans la préparation du vaccin.

Braga [16] décrit un procédé de culture du virus aphteux dérivé des méthodes de Hecke et de Frenkel. Il cultive des virus adaptés au cobaye dans des plasmas et extraits de cerveaux et muscles d'embryons de cobayes et des virus d'origine bovine dans des milieux bovins.

S'inspirant de la méthode de Braga, Palma-Zuolaga cultive le virus aphteux sur des tissus fœtaux d'origine bovine. Il emploie la méthode classique, en goutte pendante ou en flacons d'Erlenmeyer [84].

Pour effectuer ses cultures Palma-Zuolaga choisit après de multiples essais : la peau de fœtus de 3 mois comme tissus de culture, le plasma bovin comme support et milieu nutritif, des extraits de cerveau et de muscles embryonnaires en solution de Ringer comme apport de tréphones. En travaillant avec de tels constituants il a réussi à cultiver les trois sortes de virus aphteux avec des résultats constants. En outre le virus de culture permet la préparation d'un vaccin concentré selon la méthode de Vallée, Schmidt, Waldmann qui donne toute satisfaction sur le terrain.

En 1947, J.-A. Thomas, J.-P. Thiery, L. et L. Salomon [92], mettent au point une méthode très originale de culture du virus aphteux sur fœtus de bovin en survie aseptique dans un cœur-poumon artificiel.

Les fœtus utilisés pour la culture sont âgés de 3 à 6 mois et peuvent peser jusqu'à 9 kg.

Les utérus gravides sont prélevés tout de suite après l'abatage des vaches et amenés au laboratoire, dans une étuve portative, les artères utérines étant pincées.

Dans une salle aseptique aménagée, le fœtus est extrait de l'utérus ; une canule métallique reliée au cœur-poumon, est fixée dans une des artères ombilicales, tandis que l'autre est pincée.

La masse sanguine du fœtus est alors chassée grâce à une première perfusion de un litre de sérum sanguin. Au cours de ce lavage, d'une durée de 20 minutes, qui a pour but d'éliminer le fibrinogène, le fœtus naturellement rose se décolore et devient exsangue.

Le fœtus est ensuite déposé dans la cuve à organe du cœur-poumon où il peut baigner ou non dans le liquide soit artériel, soit veineux, automatiquement renouvelé.

Le milieu de perfusion est composé de sang de vache adulte, défibriné et dilué à 50 % dans une solution tampon glucosée, additionnée de pénicilline. Le pH du milieu est ajusté à 7,6.

On utilise une quantité de liquide variant entre 5 et 10 litres. La température de l'incubation est réglée entre 36 et 38°. Le rythme des pulsations est de 80 à 90 à la minute.

Le virus aphteux est inoculé en intradermique, sur toute la surface du fœtus à l'aide d'un inoculateur à aiguilles multiples.

Toutes ces manipulations devront être effectuées très aseptiquement. Après 30 à 48 heures d'incubation, la peau du fœtus est prélevée, broyée, mise en suspension en solution physiologique tamponnée, puis filtrée et titrée.

Les auteurs ont pu par cette méthode obtenir des centaines de grammes de peau hautement virulente. Le pouvoir pathogène et antigène du virus de culture n'est pas modifié pour les bovins. Un vaccin fabriqué selon la méthode Vallée-Schmidt-Waldmann, a donné aux auteurs de bons résultats.

A partir de 1947, Frenkel [33] modifie sa méthode et réussit la culture du virus aphteux sur l'épithélium de langue de bœuf, en milieu de Lilian-Baker. Par ce procédé le virus aphteux a pu être cultivé en quantité considérable. Une langue de bœuf peut donner 300 cc d'un virus hautement virulent (dont le titre varie de 1 : 650.000 à 1 : 1.000.000).

En outre le virus obtenu selon Frenkel peut remplacer le virus provenant d'animaux vivants dans la fabrication du vaccin. Les expériences faites par Henderson [51] ; Fogedby et Johnson ; Mace, Dunne, Eichhorn et Camargo [70] ; Girard et Mackowiak [40] montrent que le vaccin préparé à partir du virus de culture, est d'égale valeur que celui produit en partant du virus obtenu sur bœufs. Le prix de revient de ce virus est relativement bas.

Avec la culture Frenkel une nouvelle phase a commencé dans la production industrielle du virus aphteux ; il en résulte une plus large extension de la lutte contre la fièvre aphteuse.

Dans ce travail nous ferons une description détaillée de la culture Frenkel, telle qu'elle est pratiquée à l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse.

B. — LA CULTURE DU VIRUS APHTEUX SELON FRENKEL

1. — MILIEUX DE CULTURE

Frenkel dans une série de travaux remarquables a mis au point une technique et des milieux qui ont permis la culture en masse du virus aphteux.

Les milieux nutritifs employés sont de deux ordres :

- a) Milieu Frenkel (Milieu de Lilian-Baker modifié) ;
- b) Milieu au sérum ultrafiltré.

a) *Milieu Frenkel*

Méthionine	0,200 gr
Leucine	0,130 gr
Phénylalanine	0,050 gr
Tryptophane	0,100 gr
Histidine	0,038 gr
Thréonine	0,085 gr
Cystéine (HCl)	0,125 gr
Lysine (HCl)	0,200 gr
Glutathion	0,010 gr
Arginine	0,050 gr
Niacine	0,001 gr
Acide Panthoténique	0,250 mgr
Tyroxine	0,009 mgr
Hémine	0,036 mgr
Insuline	0,900 U.I.

NaCl	7,200 gr
CaCl ₂	0,180 gr
KCl	0,180 gr
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,090 gr
Glucose	1,000 gr
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,045 gr
Peptone	3,000 gr
Solution tampon	32 cc
Eau distillée	1.000 cc

Tampon Frenkel à pH = 7,6

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,6 gr
Na ₂ H ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	36 gr
H ₂ O distillée	1.092 cc

Au cours de la préparation du milieu les 6 premiers acides aminés qui se dissolvent difficilement seront incorporés dans environ 500 cc de l'eau distillée et placés au bain-marie à 50° C. A cette température ils mettent environ une heure pour se dissoudre.

La totalité des constituants étant incorporée, on mélange le milieu à l'aide d'une tige de verre jusqu'à totale dispersion et solubilisation des grumeaux de peptone et des sels. Le liquide obtenu est de couleur laiteuse, son pH est de 7,3.

Le milieu est alors filtré sur filtre Seitz monté avec des plaques E.K.S. (on monte 1 plaque pour 15 à 20 litres de milieu). La filtration s'effectue sous une pression de 200 grammes d'eau. Le milieu est recueilli à sa sortie dans des flacons en verre d'une contenance de 10 litres et stocké au frigorifique à + 4° C où il peut être conservé pendant environ 15 jours.

Le pH augmente légèrement pendant la filtration, il est de 7,5.

Le point de congélation du milieu Frenkel est — 0,56° C.

b) Milieu au Sérum Ultra-filtré

Les travaux de Simms et de Sanders [99, 100] ont montré l'intérêt pour les cultures cellulaires de l'emploi d'un ultra-filtrat de sérum de cheval ou de bovidé qui apporte aux tissus de culture des éléments nutritifs essentiels et retarde l'apparition de la dégénérescence grasseuse des cellules.

Les travaux de L. Mace, H. Dunne, E. Eichhorn et F. Camargo [70] ont montré qu'on pouvait aisément se servir d'un milieu simplifié dont la base est le sérum de bovin ultra-filtré.

Mode de préparation du sérum ultra-filtré.

Un ou plusieurs bovins sont saignés à blanc. Le sang est recueilli dans des berthes et immédiatement défibriné dans des défibrineurs (genre de baratte), puis centrifugé, à l'aide d'une centrifugeuse du type Alfa-Laval, pour éliminer les éléments figurés (globules rouges et globules blancs).

L'ultrafiltration du sérum ainsi obtenu s'effectue à l'aide de membranes de cellophane ; le filtre Seitz convient dans ce cas [40].

Les feuilles de cellophane, appliquées sur la face d'entrée du liquide, doublent les plaques d'amiante clarifiantes qui servent de support. Une pression de 3,500 kg. par centimètre carré à l'entrée du filtre est obtenu à l'aide d'azote comprimé. Le sérum ultrafiltré étant très putrescible, le filtre Seitz est monté avec sa chambre d'inversion, les dernières plaques étant stérilisantes.

Un filtre de 14 feuilles de cellophane débite, en moyenne, 0,500 litre par heure. Toutefois le premier liquide n'apparaît guère qu'à partir de la 4^e heure. Au début le débit est voisin de un litre par heure ; il se ralentit progressivement au fur et à mesure que les couches protéïques orientées qui se forment colmatent le filtre. Dans la pratique le sérum ultrafiltré est un produit moyen récolté sur 72 heures de fonctionnement, temps au bout duquel le filtre est renouvelé.

L'ultrafiltrat est stocké au frigorifique à + 4° C ; il doit être utilisé dans les 8 à 10 jours qui suivent car il a tendance à s'oxyder.

Le sérum ultrafiltré n'est pas employé seul, il est additionné d'un nombre assez grand de constituants.

Composition du milieu au sérum ultrafiltré :

Eau distillée	1.000 cc
Tampon Frenkel	32 cc
NaCl	7,2 gr
MgCl ₂	0,090 gr
KCl	0,180 gr
CaCl ₂	0,180 gr
Cystéine (HCl)	0,125 gr
Glutathion	0,100 gr
Hémine	0,036 mgr
Tyroxine	0,009 mgr
Insuline	1 U.I.

Vitamine A	0,0125 mgr
Vitamine D	0,001 mgr
Vitamine C	2,5 mgr
Na_2HPO_4	0,050 gr
NaHCO_3	1,000 gr
Peptone	6,750 gr
Rouge de phénol	0,0125 gr

Ce milieu est stérilisé par filtration et mélangé à raison de 800 cc pour 200 cc de sérum ultrafiltré. Le mélange a un pH de 7,2, on rajuste à 7,3 avec du NaHCO_3 .

La tyroxine est solubilisée à raison de 10 mgr pour un litre d'eau alcalinisée avec de la soude N/10 (pH=8,3) et conservée à + 4°.

L'Hémine est dissoute dans un tampon borate de composition suivante :

Ac. borique	0,377 gr
Soude N/10	36 cc
Eau distillée q.s.p	100 cc
pH = 9,4	

On incorpore 10 mgr d'Hémine pour 100 cc du tampon.

La solubilisation de l'Hémine est lente, elle dure environ 24 heures. La conservation se fait à + 4° C.

2. PRÉPARATION DES ÉPITHÉLIUMS

Lors d'épizootie de fièvre aphteuse dans un pays, l'extension de cette maladie peut être telle qu'il devient très difficile de se procurer une quantité suffisante d'épithélium lingual réceptif. En effet lors de la dernière épizootie d'Europe occidentale il était difficile de trouver un nombre suffisant de bovin réceptifs susceptibles d'être utilisés pour la production du virus par la méthode classique de l'inoculation linguale. Souvent pas plus de 30 % des animaux inoculés présentaient des aphtes sur la langue, le reste des animaux ayant été immunisés par la maladie naturelle. Ce fait a donc constitué une grande difficulté pour la production du vaccin par la méthode classique.

Ce fait a dû également être pris en considération, bien qu'à un degré moindre que sur les animaux vivants, pour l'épithélium lingual, employé pour la culture in vitro du virus de la fièvre aphteuse. En effet Frenkel [34] a pu démontrer qu'après

un certain temps, assez court d'ailleurs, les langues de bovins infectés ou vaccinés au préalable peuvent être utilisées. Cette particularité se conçoit facilement ; l'épithélium isolé de son substratum biologique est moins apte à réagir contre une infection massive qu'un organisme vacciné qui possède tous les éléments de lutte contre le virus (immunité humorale et tissulaire). Cependant on observe une diminution du titre du virus de culture. Pour plus de sécurité, il est donc préférable d'utiliser les épithéliums de bovins n'ayant jamais contracté la fièvre aphteuse. S'ils ne peuvent être obtenus en quantité suffisante dans certains pays, ils doivent être importés de pays indemnes de la maladie [34].

a) Récolte des épithéliums

Le prélèvement des épithéliums linguaux doit s'effectuer le plus rapidement possible après l'abatage des animaux, avant que la rigidité cadavérique ne soit intervenue.

Aussitôt après l'abatage des bovins, les langues sont prélevées avec le larynx et les premiers anneaux trachéaux puis mises dans des lessiveuses et portées immédiatement au laboratoire où elles vont y subir différentes manipulations.

Les langues sont d'abord rincées sommairement sous un jet d'eau tiède, puis fixées solidement à l'aide d'érignes, sur des cylindres métalliques spéciaux, de telle sorte que la trachée et le larynx se trouvent à l'intérieur du cylindre.

Les langues ainsi fixées, sont soigneusement lavées à l'eau savonneuse tiède, brossées énergiquement, rincées et placées sur des plateaux où on les laisse s'égoutter quelques instants.

Les cylindres chargés, sont fixés sur un appareil spécial comportant 5 brosses concaves solidarisées par un axe et qui s'appliquent étroitement sur les langues. Le brossage dure 2 à 3 minutes et s'effectue grâce à un mouvement pendulaire des brosses (de va et vient), tandis que les langues sont abondamment arrosées avec de l'alcool à 70° qui est récupéré dans un réservoir ; il sera distillé et pourra servir à des opérations ultérieures. La stérilisation des langues est complétée par 2 ou 3 minutes d'irradiation ultra-violette qui s'effectue dans un petit tunnel en aluminium.

Ces manipulations simples en apparence sont en réalité d'une application extrêmement délicate et constituent sans doute la

difficulté principale de la culture Frenkel. En effet la surface des épithéliums à stériliser est rugueuse, elle présente des anfractuosités et des plis, ou même des lésions, extrêmement riches en microorganismes et que les agents antiseptiques n'atteignent que difficilement.

b) *Découpage*

Pour effectuer cette manipulation 2 opérateurs sont nécessaires. Ils devront se laver les mains à l'alcool et travailler avec une cagoule.

La salle est irradiée au préalable aux rayons ultra-violets. Des bocalux en verre stériles d'une contenance de un litre sont préparés et reçoivent 250 cc de liquide Frenkel.

Le découpage se fait à l'aide du couteau Berkel (Modèle P 14) à lame circulaire. (Cet appareil est couramment utilisé en charcuterie).

La lame est d'abord badigeonnée avec de l'alcool à 70° puis flambée.

Pour faciliter le découpage, on laisse égoutter sur la partie tranchante en action du sérum physiologique stérile.

La surface de la langue est présentée devant le couteau rotatif.

On effectue un premier découpage très superficiel dans le but de débarrasser l'épithélium de sa couche kératinisée riche en microorganismes.

Puis la lame est de nouveau badigeonnée avec de l'alcool à 70° et flambée.

On procède alors à un deuxième découpage à la faveur duquel les couches profondes de l'épithélium sont détachées.

Celles-ci sont recueillies sur la lame en action avec des pinces à dents de souris et introduites dans les bocalux contenant le liquide Frenkel. Chaque bocal reçoit les épithéliums de 4 à 5 langues puis il est pesé.

Les muscles linguaux ne doivent pas être intéressés, car ils rendent le milieu nutritif rapidement acide par formation d'acide lactique qui est nuisible au développement du virus.

Le découpage doit se faire avec toutes les précautions d'asepsie et doit tendre à l'obtention de lambeaux épithéliaux très minces pour porter au maximum la surface de multiplication du virus.

Cette technique de prélèvement des épithéliums a rendu possible l'extension de la méthode de Frenkel sur le plan industriel.

Jadis il fallait 6 heures à 4 spécialistes pour préparer 100 langues ; actuellement un homme découpe 35 à 40 langues à l'heure.

L'année dernière encore, avant la mise en culture les épithéliums étaient finement divisés pendant 12 à 15 minutes à l'aide d'un ciseau mécanique.

Une simplification importante de la technique a été l'omission de ce hachage du tissu épithélial. Déjà en 1936 Frenkel et Van Waveren avaient observé qu'avec l'emploi de lambeaux entiers de peau fœtale bovine on pouvait constater une bonne multiplication du virus aphteux in vitro. Ces expériences furent répétées pour la culture du virus sur épithéliums linguaux entiers, de bovins adultes [31]. Les résultats furent très satisfaisants.

Les avantages sont évidents : moins de travail et moins de risques d'infections accidentelles. Le titre du virus obtenu est au moins aussi élevé qu'avec le tissu haché. Cette méthode a donc été adoptée.

c) *Conservation*

Dès 1949 Frenkel [36] a montré que les épithéliums linguaux peuvent être récoltés à de grandes distances et conservés à + 4° C durant au moins une semaine. Cette expérience fut confirmée lors de l'épizootie du Mexique et de France où des centres secondaires de ramassage furent créés dans le but de se procurer une quantité suffisante d'épithéliums pour la culture du virus aphteux.

Pour le transport des épithéliums Frenkel [34] a avantageusement remplacé les bocaux de verre, fragiles et relativement lourds, par des boîtes en fer blanc qui sont couramment utilisées dans l'industrie des conserves. Le titre du virus n'a nullement été influencé par ce changement. Ces expériences tendent à démontrer que l'épithélium lingual dans des conditions de milieu, de température, de pH convenables se maintient assez longtemps en vie.

Les milieux sont toujours additionnés d'antibiotiques ; le rôle de ceux-ci est primordial. Il s'avère pratiquement impossible de récolter une quantité importante d'épithéliums d'une façon absolument aseptique. C'est donc grâce à l'action bactériostatique des antibiotiques que l'on a pu réaliser sur une grande échelle les cultures de tissu d'abord, celle du virus ensuite.

Les antibiotiques les plus employés sont ceux qui ont un spectre bactériostatique étendu, sans être, cependant, toxiques à l'égard de la cellule. Il convient de les changer fréquemment ou de les associer, pour éviter l'antibio-résistance des germes.

Frenkel a préconisé les antibiotiques suivants :

Le mélange : pénicilline 5.000 U.O. + Streptomycine 50 mgr ;

ou la chloromycétine à raison de 12,5 mgr par bocal de 4 langues.

Il se peut que malgré tous les soins d'aseptie, certaines cultures soient souillées ; dans ces cas on doit s'efforcer à identifier le germe en cause et à déterminer son antibiosensibilité. Dans les cultures ultérieures on introduit l'antibiotique ou l'association d'antibiotiques actifs.

Malgré ces mesures, les contaminations par les saccharomyces sont toujours possibles ; cependant ceux-ci ne semblent pas avoir d'action néfaste sur la multiplication du virus aphteux.

3. — MÉTHODE DE CULTURE.

a) *Les récipients de culture*

Pour obtenir une culture massive du virus aphteux, Frenkel a employé au début des boîtes de Pétri, des flacons d'Erlenmeyer, puis il les a remplacés par des récipients en acier inoxydable d'une contenance d'un demi-litre, enfin il a utilisé des cuves d'une contenance de 60 litres et des tanks d'une contenance de 500 litres. C'est ces deux derniers types de réservoirs qui sont actuellement en vigueur.

Les cuves de 60 litres.

Ces cuves se composent essentiellement d'un réservoir cylindrique en acier inoxydable à double paroi (ce qui permet la circulation d'eau chaude). Elles portent à leur partie supérieure un rebord aplati sur lequel repose un couvercle que l'on fixe au moyen d'écrous. Un anneau de caoutchouc interposé entre le couvercle et la partie supérieure de la cuve assure l'étanchéité. La surface de section de la cuve doit être relativement importante pour éviter l'entassement des lambeaux épithéliaux et permettre une respiration satisfaisante des cellules.

Ce réservoir est en outre équipé avec un système d'aération et de mélange établi sur le couvercle ; on distingue en effet sur celui-ci :

Deux hublots vitrés, par lesquels on peut observer la culture.
Une ouverture qui sert auxensemencements.

Une soupape qui se continue par un tuyau se développant en couronne au fond de la cuve, partie au niveau de laquelle il est criblé de trous, et par où s'effectue la distribution du carbogène.

Un robinet d'échappement sur lequel est fixé un filtre, qui sert à l'évacuation du gaz.

Une cuvette descendant jusqu'au fond du réservoir, où l'on place le thermomètre indicateur de la température.

Un arbre en acier dont l'extrémité inférieure est un disque ; pendant la culture ce disque est animé d'un mouvement vertical lent, ce qui assure un brassage doux et régulier des épithéliums.

Les cuves sont stérilisées à l'autoclave pendant 20 minutes à 120° C.

Dans ce réservoir on peut cultiver l'épithélium de 40 à 60 langues.

Les tanks de 500 litres.

Tandis que les cuves de 60 litres sont conçues pour être incubées à 37°, les tanks de 500 litres sont de véritables groupes autonomes dans lesquels le réchauffement est assuré par une chaudière qui leur est propre. Le diamètre intérieur de ces tanks est de 80 centimètres. Ils sont montés sur trépied et peuvent être basculés, lors de la récolte de l'épithélium.

La stérilisation du tank se fait selon le principe de l'autoclave de Chamberland. A part ces quelques particularités, leur anatomie intérieure est identique à celle des cuves de 60 litres.

Dans ces réservoirs on peut cultiver de 300 à 500 épithéliums linguaux.

b) Ensemencement des cuves de 60 litres.

L'ensemencement des petites cuves s'effectue dans une pièce stérile uniquement destinée à ce genre de travail.

Les opérateurs devront se stériliser les mains à l'alcool et vêtir une blouse et une cagoule stériles.

Toutes les opérations sont pratiquées en présence de la flamme d'un bec Bunsen qui sert au flambage des orifices des récipients et entretient un courant d'air ascendant qui empêche la chute des poussières.

Sur l'ouverture de la cuve on fixe un entonnoir de gros diamètre.

On introduit alors dans chaque cuve :

- Le contenu de 10 à 12 bocalaux, soit environ 50 langues (1,5 kg d'épithélium) et 2.500 cc de liquide de Frenkel ;
- 500 cc à un litre de virus (Cette quantité varie selon le titre du virus) ;
- Dix litres de liquide de Frenkel ;
- 1.500 milligrammes de chloromycétine ou le mélange :
pénicilline 700.000 U.O + Streptomycine 7 grammes,
dissous dans 100 cc de sérum physiologique.

Le pH de la culture doit être de 7,6 (S'il est plus bas on le rajuste avec du bicarbonate de soude).

Les tanks de 500 litres permettent la culture de 500 épithéliums linguaux dans 125 litres de milieu nutritif, on introduit en outre 4 litres de virus et les antibiotiques.

c) *Mise en culture*

Les petites cuves après ensemencement sont portées dans une chambre étuve aménagée spécialement.

L'incubation se fait à 37° C.

On fait circuler dans la double enveloppe des cuves, de l'eau portée à 40° C jusqu'à ce que la température de 35° C soit atteinte (environ 1 heure).

— On fixe des moteurs électriques sur les couvercles des cuves et on les solidarise à l'arbre à l'aide d'une rotule ; ils assureront le brassage des épithéliums.

L'aération de la culture s'effectue avec du carbogène (95 % O₂ et 5 % C O₂) qui est soufflé sous une pression de 100 gr. à travers deux filtres placés sur la canalisation reliant la soupape de la cuve à la bombe du gaz.

Les bulles de carbogène provoquent la formation d'une écume au-dessus du liquide de culture, qui est généralement favorable à une bonne aération.

La durée de l'incubation est de 20 heures. Ce temps est décompté à partir du moment où le liquide a atteint la température de 37° C. Il semble que c'est au bout de ce temps là que l'épithélium atteint le maximum de virulence, quoique Fogedby et Johnson [37] semblent démontrer que les cultures incubées pendant un temps pouvant aller jusqu'à 60 heures

ont une valeur antigénique bien supérieure, alors que la virulence a déjà regressé.

4. — RÉCOLTE ET CONSERVATION DU VIRUS.

A l'ouverture des cuves on doit percevoir une odeur agréable d'orange : le liquide nutritif doit être limpide, de couleur légèrement ambrée, et de pH variant entre 6,7 et 6,9. (Toute culture trouble et dégageant une odeur putride est rejetée).

Le contenu des cuves est versé sur un tamis à mailles fines fixé lui-même sur un récipient d'une contenance de 40 litres environ ; l'épithélium reste sur les mailles du tamis. Le liquide de culture est mis en réserve. (Après centrifugation et filtration sur plaques E.K.S., il sera utilisé pour la fabrication du vaccin, comme eau de dilution).

L'épithélium est repris et va subir différentes manipulations, qui sont, dans l'ordre chronologique :

a) *Le broyage*

Le broyage s'effectue sur le moulin à amandes à 2 ou 3 rouleaux. Pour obtenir une destruction cellulaire totale, il est nécessaire de recommencer le broyage 4 ou 5 fois.

b) *La dilution*

Le broyat cellulaire est mélangé à parties égales avec du sérum de cheval préalablement filtré sur plaques C5 et E.K.S. et dilué extemporanément au 1/8 dans de l'eau distillée.

Le sérum de cheval a un rôle protecteur et permet la congélation du virus de culture [71].

c) *Le conditionnement*

Le mélange broyat-sérum est versé dans des boîtes métalliques d'une contenance de 1,5 à 2 litres ou des flacons en verre de 60 cc et 300 cc.

d) *La congélation*

Le mélange broyat-sérum est alors congelé à -15° ou -70° . La rapidité ou la lenteur de la congélation n'interviennent pas. Les prélèvements effectués sur le virus congelé après deux, quatre, six, huit mois de conservation à -25° ont montré

que le virus gardait intactes toutes ses propriétés [71]. En outre, les titres du virus sont plus réguliers. Ceci serait dû à la destruction lors de la décongélation des cellules non affectées par le broyage qui libéreraient ainsi leur virus.

La congélation permet de constituer des stocks importants de virus. L'épithélium n'est plus repris dans son liquide de culture comme dans la technique de Frenkel, car ce liquide ne permet pas la congélation ; d'autre part comme il titre très peu de virus (à peine le $1/20$ du titre total) on peut facilement admettre que tout le virus est contenu dans l'épithélium. Comme il vient d'être dit plus haut ce liquide est utilisé après centrifugation et filtration sur plaques E.K.S. à la fabrication du vaccin comme eau de dilution.

5. — TITRAGE DU VIRUS DE CULTURE.

Le virus est décongelé, homogénéisé et centrifugé. On reprend le liquide surnageant et on fait une première dilution au $1/10^{\circ}$ dans la solution tampon. (Ceci pour réaliser les mêmes conditions que dans la technique originelle de Frenkel), puis on filtre. C'est ce liquide que l'on considère comme le virus à l'état pur [40]. C'est lui qui servira auxensemencements ultérieurs. Le virus est titré aux dilutions de 10^{-5} et 10^{-6} qui sont faites de la façon suivante :

On place sur un support une série de 6 tubes et l'on introduit dans chaque 9 cc de solution tampon. Dans le premier, on ajoute avec une pipette très précise 1 cc de virus et on mélange soigneusement, puis on reprend 1 cc de cette dilution et on l'introduit dans le tube suivant et ainsi de suite. Pour diminuer les possibilités d'erreurs, on change de pipette à chaque manipulation.

a) *Titration sur langue de bovins*

Henderson dans son ouvrage « The Quantitative Study of Foot and Mouth Disease virus » a donné la technique complète des inoculations multiples et simultanées des différentes dilutions sur la langue d'un seul bœuf. Ceci permet, avec un nombre restreint d'animaux, d'augmenter considérablement le nombre des observations. Dans cette méthode la langue subit vingt inoculations intradermiques au lieu d'une seule dans la méthode

précédente. Pour le titrage du virus d'un type déterminé, on utilise un, deux ou trois bœufs. Seulement la réaction locale est prise en considération.

Il est indispensable que les bœufs qui servent au titrage du virus soient hautement réceptifs. Or, en pays où la fièvre aphteuse est endémique il est difficile de disposer à volonté d'animaux sensibles. C'est pourquoi il est nécessaire d'importer des bovins des régions ou pays indemnes de fièvre aphteuse (Bretagne, Irlande).

Les bœufs à inoculer sont anesthésiés au nesdonal (1 gr par 100 kg de poids vif). La langue est saisie à l'aide d'une serpillière et tirée hors de la bouche. Avec un crayon fushine on la divise transversalement en deux et on indique les points d'inoculation. La dilution 10^{-5} est inoculée dans la partie supérieure de la langue sur deux lignes droites transversales (10 inoculations) tandis que la dilution 10^{-6} est inoculée en 10 points similaires dans la partie inférieure.

La lecture du titrage se fait, au moment de l'élévation thermique, soit dans les 24 à 30 heures qui suivent l'inoculation. Le bovin est abattu, la langue prélevée et on compte alors le nombre des réactions positives et négatives aux dilutions respectives.

b) *Titrage sur souriceaux non sevrés*

Le souriceau à l'allaitement est très sensible à l'inoculation intrapéritonéale du virus aphteux et peut, comme l'a montré Skinner [103] avantageusement remplacer le bœuf pour les épreuves de titrage.

Cette substitution du souriceau au bœuf simplifie la méthode et on en tire de nombreux avantages : avantage économique cela va sans dire ; avantage pratique, la manipulation du souriceau étant plus facile que celle du bœuf, d'autre part l'élevage des souriceaux est facile et leur entretien peu coûteux.

Dix souriceaux sont inoculés en intrapéritonéale avec la dilution 10^{-5} et dix sont inoculés avec la dilution 10^{-6} .

La lecture du titrage se fait, dans les 24-36 heures, temps au bout duquel la paralysie du train postérieur s'installe et la mort s'ensuit rapidement, celle-ci étant prise comme critérium de l'infection.

c) *Interprétation des résultats*

Les résultats sont interprétés selon la méthode L50 (celle où la moitié des animaux succombent ou présentent des symptômes caractéristiques, alors que l'autre moitié reste indemne) et des totaux cumulatifs de Reed et Muench. Cette méthode permet d'augmenter le nombre des réactions intervenant dans le calcul et par là, de réduire d'autant les chances de variations individuelles dues au hasard.

Les titres peuvent être calculés selon les procédés graphique, arithmétique [65] ou plus facilement grâce aux tables de calcul établies par Henderson et qui comportent les combinaisons arithmétiques que donnent les différents chiffres possibles des réactions.

Les titres obtenus sont variables, ils oscillent entre 250.000 U.I. et 2.000.000 U.I.

TECHNIQUE DE HENDERSON — CALCUL DE REED ET MUENCH

Méthode de titrage sur un bovin ou 20 souris.

<i>Dilution</i>	<i>Dilution</i>	<i>Titre</i>
10— ⁵	10— ⁶	
Réaction positives		
10	10	10.000.000
10	9	5.000.000
10	8	3.150.000
10	7	2.025.000
10	6	1.400.000
10	5	1.000.000
10	4	740.000
10	3	580.000
10	2	460.000
10	1	380.000
10	0	315.000
9	9	4.850.000
9	8	2.900.000
9	7	1.750.000
9	6	1.200.000
9	5	890.000
9	4	630.000
9	3	440.000
9	2	380.000
9	1	315.000
9	0	260.000

<i>Dilution</i>	<i>Dilution</i>	<i>Titre</i>
10—5	10—6	
8	3	2.417.000
8	7	1.540.000
8	6	1.000.000
8	5	710.000
8	4	515.000
8	3	395.000
8	2	315.000
8	1	260.000
8	0	215.000
7	7	1.260.000
7	6	810.000
7	5	560.000
7	4	410.000
7	3	315.000
7	2	250.000
7	1	210.000
7	0	170.000
6	6	635.000
6	5	430.000
6	4	320.000
6	3	242.000
6	2	190.000
6	1	158.000
6	0	132.000
5	5	315.000
5	4	230.000
5	3	175.000
5	2	142.000
5	1	118.000
5	0	100.000
4	4	185.000
4	3	120.000
4	2	100.000
4	1	85.000
4	0	72.000
3	3	79.000
3	2	66.000
3	1	56.000
3	0	49.000
2	2	41.000
2	1	34.000
2	0	31.000
1	1	20.000
1	0	18.000

6. — LES PETITES CULTURES.

Les petites cultures qui sont menées parallèlement aux cultures de fabrication, servent à l'entretien des souches, à l'adaptation de nouveaux virus et à l'expérimentation.

La culture s'effectue dans un flacon d'Erlenmeyer de 500 cc à large ouverture.

A 125 cc de milieu Frenkel on ajoute 15 grammes d'épithélium lingual (une demi-langue), 10 à 15 cc de virus, puis le mélange pénicilline 5.000 U.O., streptomycine 50 mgr, pour assurer la bactériostase.

Le flacon est fermé avec un bouchon en caoutchouc qui comporte deux tubes capillaires en verre. L'un d'eux descend jusqu'au fond de l'Erlenmeyer, il est relié par son extrémité supérieure à une bouteille de carbogène. Le carbogène qui est filtré assure l'aération et le brassage des cellules en culture. L'autre tube sert à l'évacuation du gaz.

Après 20 heures d'incubation à 37° C le tissu est séparé du milieu, broyé dans un mortier avec du quartz stérile, remis en suspension dans son milieu et centrifugé 20 minutes à 4.000 tours. Le liquide surnageant est filtré sur plaques E.K.S. sous faible pression. Le virus ainsi obtenu est gardé au frigidaire à + 4° C.

Les passages sont faits régulièrement toutes les semaines et le virus titré tous les 15 jours.

7. — FABRICATION DU VACCIN.

Toutes les manipulations s'effectuent entièrement dans une chambre frigorifique à une température de + 4° C. De cette façon les risques d'élévation thermique si nuisible au virus sont écartés.

Le virus (30 kgs du mélange, broyat cellulaire-sérum pour mille litres de vaccin) est sortit du congélateur 20 heures avant de subir les manipulations en vue de la fabrication du vaccin. Il est d'abord placé pendant 4 heures à la température du laboratoire, puis environ 16 heures à + 4° C. Au bout de ce temps le broyat est passé pendant 10 minutes au cutter (couteau polylames tournant à 600 tours/minute) afin de dissocier les petits blocs cellulaires encore glacés, puis il subit trois dilutions successives et un tamissage ; l'épithélium retenu sur les mailles du

tamis est repris et repasse au cutter pendant 10 minutes encore et subit trois nouvelles dilutions. Toutes ces manipulations tendent à faire passer en solution tout le virus contenu dans les cellules. (Au cours des 6 dilutions on utilise 120 litres d'eau distillée).

Le liquide virulent est passé ensuite trois fois à l'homogénéisateur pourvu, dans l'ordre chronologique, des obturateurs 260, 235 et 215. Cette manipulation a pour but de continuer le déchiquetage des cellules en les faisant passer à travers des trous très fins, en chicanes, sous une pression de 150 kgs par cm². (Le bol de l'homogénéisateur devra être nettoyé 3 fois, car il y a formation d'un dépôt très important). La suspension virulente est alors centrifugée dans une centrifugeuse du type Alfa-Laval afin d'éliminer la boue cellulaire.

Enfin le liquide virulent est filtré ; dans ce but il est transvasé dans un réservoir cylindrique en métal inoxydable d'une contenance de 220 litres dont l'un des orifices situé sur le couvercle, est relié à une canalisation d'air comprimé, l'autre disposé à la partie inférieure, est en communication avec le premier filtre monté avec des plaques clarifiantes (C5), et relié lui-même à un deuxième filtre monté avec sa chambre d'inversion [les premières plaques sont clarifiantes (C10) et les dernières stérilisantes (E.K.S.)]. Le liquide virulent est recueilli dans un réservoir stérile d'une contenance de 500 litres qui est taré pour recevoir 280 litres de liquide. Ce réservoir est directement relié au mélangeur (récipient où est fabriqué le vaccin) par une canalisation qui permet l'aspiration du virus directement dans celui-ci.

La progression du liquide dans tout ce montage est assurée grâce à une pression de 250 grammes d'eau au cm² exercée en tête de l'installation par de l'air comprimé. On met environ 2 heures pour filtrer une centaine de litres de liquide.

Lorsque le liquide virulent a entièrement traversé les filtres, on lave ceux-ci avec 140 litres d'une solution tampon comprenant :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,91 gr
KH_2PO_4	6,10 gr
Eau distillée	1.000 cc

Toutes ces opérations terminées, on procède alors à la fabrication du vaccin. Dans ce but, on introduit dans un réservoir (mélangeur) de grande capacité et à double paroi, les constituants suivants (quantité pour la fabrication de 1.000 litres de vaccin) :

450 litres d'hydroxyde d'aluminium préalablement titré et à $\text{pH} \pm 7$.
250 litres d'eau distillée à $\text{pH} = 5,8$.

10 litres de tampon glycocolle à $\text{pH} = 10,2$, comprenant :

NaOH	510	grs
NaCl	1.040	grs
Glycocolle	1.580	grs

Le pH du mélange est de 9,4-9,5.

Le mélangeur est alors fermé hermétiquement et l'on procède à la stérilisation du mélange par l'admission de vapeur dans la double enveloppe, sous pression de 3 kg, et à l'intérieur du réservoir sous pression de 1 kg. Après environ 2 heures et demie la température atteint 120° . La stérilisation doit durer une demi heure, puis on laisse refroidir jusqu'à 26° .

On met alors le mélangeur qui est muni d'un agitateur, en marche et on aspire les 280 litres du liquide virulent grâce au vide. Enfin trente minutes après on introduit 10 litres d'une solution de formol à 50 % préalablement titré.

L'atténuation du virus se poursuit pendant 24 heures à 26° , temps au bout duquel le vaccin est conditionné, mais il ne pourra être vendu qu'après avoir subi toute une série de contrôles : bactériologique, d'inocuité et d'efficacité.

8. — VALEUR ANTIGÉNIQUE DU VIRUS DE CULTURE.

En général, l'immunité conférée par le virus de culture est de même intensité et de même durée que celle établie par le virus de passage *in vivo*.

Les expériences de Frenkel ont montré que le vaccin fabriqué à partir du virus de culture avait un pouvoir immunisant au moins aussi élevé que celui obtenu à partir des aphtes. La pratique de la vaccination en Hollande a d'ailleurs donné d'excellents résultats.

Fogedby et Johnson [37] au Danemark ainsi que Mace, Dunne, Eichhorn et Camargo [70] au Mexique confirment

les travaux de Frenkel, et démontrent que les vaccins préparés avec le virus de culture donnent des résultats tout à fait satisfaisants dans la pratique. Henderson et Galloway [51] montrent qu'il n'y a aucune différence significative dans la valeur immunigène de vaccins préparés en partant soit du virus d'aphtes, soit du virus de culture. En France, les résultats ont également été encourageants.

Avec la technique établie par Frenkel, la base d'une grande production de virus à prix réduit vient d'être posée et par là, celle d'une grande production de vaccin à bas prix. Il est à supposer qu'on pourra faire des progrès ultérieurs quand divers laboratoires s'occupant de fièvre aphteuse feront entrer la méthode Frenkel dans leur travail journalier.

CONCLUSIONS

I. — La culture *in vivo*, *in ovo*, *in vitro* des ultravirus, a contribué à l'accroissement considérable de nos connaissances sur ces agents, leur cycle évolutif, la symptomatologie des maladies qu'ils provoquent et la physiopathologie des cellules parasitées.

II. — Une notion fondamentale est pleinement confirmée par cette étude : l'impossibilité où l'on est encore aujourd'hui de cultiver les ultravirus en dehors de la cellule vivante.

III. — La culture *in vivo* a été pendant longtemps la seule méthode d'étude des ultravirus ; elle a rendu des services précieux dans la lutte contre les maladies viriennes. Néanmoins, cette technique offre des inconvénients non négligeables, ce qui lui fera préférer, dans certains cas, des méthodes de culture plus élégantes.

IV. — L'emploi de l'œuf embryonné pour la culture des ultravirus a permis d'élucider un grand nombre de problèmes en virologie. En outre, grâce à cette méthode, il a été possible de préparer des vaccins doués d'une grande efficacité pour lutter contre les maladies infectieuses.

V. — Tous les ultravirus ont été cultivés *in vitro*. La prolifération pratiquement indéfinie de nombreux d'entre eux a été obtenue. La méthode s'est révélée d'une grande efficacité dans l'étude théorique des virus d'une part ; d'autre part, certains d'entre eux, ainsi le virus aphteux de culture, ont pu être utilisés avec succès dans la lutte contre la maladie naturelle.

VI. — La culture *in vivo* du virus aphteux a été tentée chez presque tous les mammifères. Différents artifices ont été utilisés pour augmenter la sensibilité des animaux. En définitive, les seules espèces ayant un intérêt pratique sont : le bœuf pour la production du virus et le souriceau pour le titrage de celui-ci.

VII. — La culture in ovo du virus aphteux n'a pas donné jusqu'ici les résultats escomptés. La plupart des expérimentateurs ont échoué et les rares travaux positifs n'ont pas été confirmés.

VIII. — La culture in vitro du virus aphteux selon la méthode mise au point par Frenkel a permis d'obtenir des quantités importantes de virus, origine d'un vaccin d'importance clinique considérable.

Vu : LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
GORET.

Vu : LE DIRECTEUR
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE,
JUNG.

Vu :
LE DOYEN
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,
A.-H. HERMANN.

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
PROFESSEUR SEDALLIAN.,
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 6 Mai 1955.
LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMSON (I.). — *Bulletin of the World Health Organisation*, 1954.
2. ALEXANDER (R.A.). — *Onderstepoort J. Vet. Sc. an. Ind.* 1947, t. 22, p. 7-26.
3. ALEXANDER (R.A.), HAIG (D.A.). — *Onderstepoort J. Vet. Sc. an Ind.*, 1947, t. 21, p. 231-241.
4. ALEXANDER (R.A.), NEITZ (V.O.), ADELAAR (T.F.). — *J. South African Vet. Med. Assoc.*, 1947, t. 18, p. 51-58.
5. ALEXANDER (R.A.), DU TOIT. — *Onderstepoort J. Vet. Sc.*, 1934, t. 2, p. 375.
6. ANDERSON (K.). — *Am. J. Path.*, 1940, t. 16, p. 137.
7. BAKER (J.A.). — *Am. J. of Vet. Res.*, 1946, vol. 7, n° 23.
8. BAKER (J.A.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1946, t. 63, p. 183-187.
9. BANG (F.B.). — *J. exp. Med.*, 1943, t. 77, p. 337.
10. BARDACH (M.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1946, 222, 1.146-1.148.
11. BEARD (J.W.), FINKELSTEIN (H.), SEALY (W.C.), WYCKOFF (R.W.G.). — *Science*, 1938, t. 87, p. 490.
12. BELIN (Cl.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1953, t. 39, n° 1-2, p. 103.
13. BÉVÉRIDGE (W.I.B.). — *Austral. J. exp. Biol.*, 1944, t. 22, p. 169.
14. BÉVÉRIDGE (W.I.B.), BURNET (F.M.). — *La culture des virus et des Rickettsies dans l'embryon de poulet*. Ed. Méd. Flammarion, 1947.
15. BLANC (C.), MARTIN (L.A.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 227, 242.
16. BRAGA (A.). — *Bol. do. Inst. Vital Brazil*, 1930, n° 22, p. 5.
17. BROTHERRSON (L.), PURCHASSE (H.S.). — *The British Vet. J.*, 1952, vol. 108, p. 96.
18. BURNET (F.M.). — *Med. J. Austral.*, 1943, t. 41, p. 385.
19. BURNET (F.M.), LUSH (D.). — *J. Path Bact.*, 1936, t. 43, p. 105.
20. CABASSO (V.), COX (H.R.). — *Proced. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1949, t. 71, p. 241.
21. CARREL (A.), BURROWS (M.T.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1910, t. 69, p. 293.
22. CARREL (A.), RIVERS (T.M.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1927, t. 96, p. 848.
23. CORDIER (G.). — *Rec. Med. Vet.*, 1940, 116, 254-261.
24. DOBSON (N.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1951, t. 35, n° 1-2.
25. DUCLOUX (P.), RINJARD (P.), CORDIER (G.). — *C.R. Ac. Sc.* 1929, 188, 945-947.
26. EDWARDS (). — *Trans. III^e Cong. Far. East Assoc. trop. Med.*, 1929, 699.

27. EICHHORN (E.A.), MANTHEI (C.A.). — *J. Am. Vet. and Med. Assoc.*, 1939, t. 94, p. 608.
28. FAUCONNIER (B.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, t. 85, n° 2, p. 228 et 1954, t. 86, n° 6, p. 710.
29. FERMI (Cl.). — Revue critique sur les principales méthodes antirabiques, 1934, Gallizzi-Sassari.
30. FRANCIS (T.), SALK (J.E.), PEARSON (), BROWN (). — *Am. J. Hyg.*, 1945, 42, 57.
31. FRENKEL (H.S.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1937, 14, 345 et 1937, 14, 208.
32. FRENKEL (H.S.). — *Am. J. of Vet. Res.*, 1950, vol. 11, n° 41, p. 371 et 1951, vol. 12, n° 44.
33. FRENKEL (H.S.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1947, 28, 155-162.
34. FRENKEL (H.S.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1953, t. 39, n° 1-2, p. 94 et p. 135.
35. FRENKEL (H.S.). — *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, sept. 1949, vol. 115, n° 870, p. 178.
36. FRENKEL (H.S.), DUNNE (H.), OSTEEN (O.). — *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1949, p. 175.
37. FOGEDBY (E.), JOHNSON (M.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1952, 37, 473.
38. GARCIA (E.), MATA (J.), PISSI (C.), ARAMBURU (H.). — *Gaceta Vet.*, nov.-déc. 1951.
39. GEY (G.O.). — *Am. J. Cancer*, 1933, 17, 752.
40. GIRARD (H.), MACKOWIAK (C.). — *Revue d'Immunol.* 1953, t. 17, n° 4-5, p. 224-238.
41. GOODPASTURE (E.W.), ANDERSON (K.). — *Arch. Path.*, 1940, t. 30, p. 212.
42. GOODPASTURE (E.W.), ANDERSON (K.). — *Am. J. Path.*, 1942, t. 18, p. 563.
43. GOODPASTURE (E.W.), DOUGLAS (D.), ANDERSON. — *J. exp. Med.*, 1938, t. 68, p. 891.
44. GOODPASTURE (E.W.) et Coll. — *Am. J. Hyg.*, 1935, t. 21, p. 319.
45. GOODPASTURE (E.W.), WOODRUFF (A.M.), BUDDINGH (G.Y.). — *Am. J. Path.*, 1932, t. 8, p. 271.
46. GORET (P.), MARTIN (L.A.), JOUBERT (L.). — *Bull. Ac. Vét. de France* 1952, t. 35, n° 9, p. 405.
47. GORET (P.), Mlle YVORE. — *C.R. Soc. Biol.*, 1947, t. 141, p. 423 et p. 932.
48. HADDOW (), IDNANI (). — *The Indian J. of Vet. Sc.*, juin 1946 et *The Tropical Agriculturist*, juil.-sept. 1947.
49. HAIG (D.A.). — *Onderstepoort J. Vet. Med.*, 1948, 23, 149.
50. HECKE (F.). — *Zentrabl. Bakt.*, 1930, Orig 116, 386-414.
51. HENDERSON (W.), GALLOWAY (I.). — A comparison between foot and mouth disease vaccines prepared from tongue epithelium of reacting cattle and vaccines prepared from culture tissues (communication à publier).
52. HUSSON (R.A.), KOERBER (R.). — *Am. Inst. Pasteur*, 1953, t. 85, n° 6, p. 735.
53. IYER (S.G.), DOBSON (N.). — *Vet. Rec.*, 1940, t. 52, p. 889.

54. JACOTOT (H.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1950, t. 33, n° 3-4, p. 168.
55. JOHNSON (H.N.). — *Bull. de l'Org. Mond. de la Santé*, (1954, 10, 725-729.
56. KAPLAN (M.), GOOR (Y.), TIERKIEL (E.S.). — *Bull. of the World Health Org.*, 1954, 10, 743.
57. KAMAROW (A.), HORNSTEIN (K.). — *Cornell Vet.*, 1953, 43, 344.
58. KOPROWSKI (H.). — *Bull. of the World Health Org.*, 1954.
59. KOPROWSKI (H.), BLACK (J.). — *J. Immunol.*, 1950, 64, 185 et *Proced. Vltb Inter. Cong. for. Micorb*, vol. II, p. 134.
60. KOPROWSKI (H.), BLACK (J.), NELSEN (), DORIS (). — *J. Immunol.*, 1954, 72, 94.
61. KOPROWSKI (H.), COX (H.R.). — *J. Immunol.*, 1948, 60, 533.
62. KOPROWSKI (H.), JAMES (L.), COX (H.R.). — *Proced. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1946, 63, p. 178.
63. KOPROWSKI (H.), LE BELL (J.F.). — *Am. J. Hyg.*, 1950, 51, 292.
64. KOPROWSKI (H.). — *Am. J. Med.*, 1950, 8, 412.
65. LEVADITI (C.), LÉPINE (P.). — *Les Ultravirus des maladies humaines*. Maloine (1948).
66. LUCAM (F.), GORET (P.). — *Bull. Soc. Sc. Vét., Lyon*, 1950, 52, 129 — *C.R. Ac. Sc.*, 1951, 233, 107.
67. LUCAM (F.), GORET (P.). — *Bull. Ac. Vet. de France.*, 1953, t. 26, n° 1, p. 67.
68. LI (C.P.), RIVERS (T.M.). — *J. exp. Med.* 1930, 52, 465.
69. LUSH (D.). — *Austral. J. exp. Biol.*, 1939, t. 15, p. 131.
70. MACE (L.), DUNNE (H.), EICHHORN (E.), CAMARGO (F.). — *J. of Inf. Dis.*, 1951, 88.
71. MACKOWIAK (C.), GIRARD (H.), LANG (R.). — *Ann. Inst. Pasteur*, t. 87, n° 10, p. 465.
72. MAITLAND (H.B.), MAITLAND (M.C.). — *Lancet*, 1928, 215, 596 et *J. Comp. Path. a Therap.*, 1931, 44, 106.
73. MARQUE (), KOUMARÉ (), FALLEY (). — *Revue de l'El. des pays trop.*, t. III, 1943, p. 39.
74. MARTIN (L.A.). — *Bull. Ac. Vet. de France*, 1950, 23, 291.
75. MARTIN (L.A.), GORET (P.), JOUBERT (L.), TOUCAS (L.). — *Bull. Ac. Vét. de France*, 1950, 23, 299.
76. MASON (J.H.), COLES (J.D.), ALEXANDER (R.A.). — *Nature Lond.*, 1940, t. 145, p. 1.022.
77. MAURIN (J.A.). — *Adaptation de la culture des tissus à l'étude des virus*. Thèse Doctorat en Médecine, Paris, 1949.
78. MICKELSEN (E.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1951, t. 35, n° 11-12, p. 574.
79. MILLER (G.L.). — *J. exp. Med.*, 1944, t. 39, p. 173.
80. MURPHY (J.B.), ROUS (P.). — *J. exp. Med.*, 1912, t. 15, p. 119.
81. NICOLLE (C.), ADIL BEY. — *Ann. Inst. Pasteur.*, 1901, 15, 75.
82. NELSON (J.B.). — *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.*, 1940, t. 43, p. 110.
83. PARKER (R.C.), MORGAN (J.F.). — *Methods of tissu culture*. Paul B. Hoeber Inc. 2^e édition. oct. 1950.
84. PALMA-ZUOLAGA (E.E.). — *Vet. Med U.S.A.*, 1949, 44, 90 et *Off. Int. Epiz.*, 1948, 29, 397.

85. PELTIER (P.), DURIEUX, JONCHÈRES, ARQUÉ. — *Bull. Ac. Méd.*, 1939, 121, 657 et 1940, 123, 137.
86. PERRUMAL (C.), PILLAI (K.). — *The Trop. Agriculturist*, oct.-déc. 1948, vol. 104, n° 4, p. 190.
87. PETERMANN (H.). — *Revista de Med. Vet.*, 1949, 4, 973.
88. PIERCY (S.E.). — *Proc. XV^e Congrès Int. Stockholm*, 1953, part. 1, vol. 1, p. 278.
89. PORTER (K.R.), CLAUDE (A.), FULLAM (E.F.). — *J. exp. Med.*, 1945, 81, 233.
90. RINJARD (P.), BARDACH (M.), BRIDRÉ (Y.). — *C.R. Soc. Ac. Sc.*, 1946, 222, 1.533-1.535.
91. ROMANOFF (A.L.), HAYWARD (F.W.). — *Biol. Bull.*, 1943, 84, 141.
92. SALOMON (L.). — *Recherches biologiques sur la culture du virus aphteux*. Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 1952.
93. SCHEIN (K.). — *Rapport de mission au Cambodge*, 1924, et *Bull. Soc. Path. exot.*, 1926, 19, 915.
94. SELLARDS-LAIGRET. — In Levaditi-Lépine. *Les Ultravirus des maladies humaines*. Maloine, 1948.
95. SIGURDSSON (B.). — *J. exp. Med.*, 1943, t. 78, p. 17.
96. SHAFFER (M.F.), ENDERS (J.F.). — *J. Immunol.* 1939, t. 37, p. 383.
97. SHOPE (R.E.), GRIFFITHS (M.J.), DUBOIS (L.Y.). — *Am. J. Vet. Res.*, 1946, t. 7, p. 135.
98. SHOPE (R.E.), MAURER (F.D.), DUBOIS (L.Y.), GRIFFITHS (H.J.), BAKER (J.A.). — *Am. J. Vet. Res.*, 1946, t. 7, p. 152.
99. SIMMS (H.S.), SANDERS (M.). — *Arch. Path.*, 1942, 33, 619.
100. SIMMS (H.S.), STILLMANN (N.P.). — *J. Gen. Physiol.*, 1937, 20, 649.
101. SMITH (W.), PENNA (H.A.), PAOLIELLO (A.). — *Am. J. trop. Med.*, 1938, t. 18, p. 437.
102. STRIEGLER (E.). — *Zentralbl. Bakt.*, 1933, Orig. 100, 312-316.
103. SKINNER (H.H.). — *Proced. of the Roy. Soc. of Med.*, déc. 1951, vol. 44, p. 1.041.
104. TENBROECK (C.). — *J. exp. Med.*, 1941, t. 74, p. 427.
105. THEILER (M.). — *Am. J. trop. Med.*, 1930, 24, 249.
106. THEILER (M.), SMITH (H.H.). — *J. exp. Med.*, 1937, t. 65, p. 787.
107. THOMAS (J.A.), THIERY (J.P.), SALOMON (L. et L.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1952, n° 9, 235.
108. TRAUB (E.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1949, 31, 470.
109. VERGE (J.), GORET (P.). — *Rev. path. comp.*, 1950, 50, 372-88.
110. VIEL (M.). — *L'Institut Français de la Fièvre Aphteuse*. Thèse Doct. Vét., Lyon, 1950.
111. WELLS (C.A.). — *Bull. World Health Org.*, 1954, 10, 731.
112. YANAMURA (H.Y.), MEYER (K.F.). — *J. Inf. Diseases*, 1941, 68, 1.
113. ZINSSER (H.), WEI (H.), FRITZPATRICK (F.L.). — *P.S.E. B.M.*, 1937.

TABLE DES MATIERES

Plan	9
Introduction	13
<i>Première partie.</i> — Culture des ultravirus in vivo	17
<i>Deuxième partie.</i> — Culture des ultravirus in ovo	35
<i>Troisième partie.</i> — Culture des ultravirus in vitro	57
<i>Quatrième partie.</i> — Mode de culture du virus aphteux	79
Conclusions	111
Bibliographie	113

— Imprimerie BOSC Frères —
42, Quai Gailleton — LYON

